

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

LAS PROTEÍNAS P, LA ESPORULACIÓN Y LA
RESPIRACIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae*

Hendricka María Camargo Martínez

Madrid, 2011

LAS PROTEÍNAS P, LA ESPORULACIÓN Y LA RESPIRACIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae*

Memoria presentada por Hendricka María Camargo Martínez para
optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma
de Madrid

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el **Centro de Biología Molecular Severo Ochoa** (CSIC-UAM) bajo la dirección del **Dr. Miguel Remacha Moreno**, profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid, y el **Dr. Juan Pedro García Ballesta**, Profesor de Investigación del CSIC. Este trabajo ha contado con la financiación de un proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación BFU2009-09738 y un proyecto intramural del CSIC 201020E026.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Madrid, 2011

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis padres (Morelsa y Henry) no solo por darme la vida, sino por apoyarme siempre en todos mis proyectos y decisiones, por creer incondicionalmente en mí, por educarme y ser mi ejemplo todos los días al levantarme. Lo que soy se los debo a ustedes. A mi hermano (Henker), a quien admiro y del que me siento muy orgullosa. A mi abuela María por su apoyo desde Maracay y porque con sus llamadas puntuales todas las semanas me hizo sentir siempre cerca de casa, “te quiero mamá”. A toda mi familia y amigos por mantenerme presente en sus vidas a pesar de la distancia y el tiempo transcurrido.

Al Dr. Francisco Javier Triana Alonso (QEPD), por confiar en mí y recomendarme como si fuese una estrella (palabras textuales); gracias “Gran Jefe” a ti dedico esta tesis.

Al Dr. Juan Pedro García Ballesta, por darme la oportunidad de cumplir el sueño de ser Doctora en Biología Molecular, por sus invalorable observaciones y recomendaciones durante el desarrollo de esta tesis y por soportar diariamente mis “escándalos” en el laboratorio.

Al Dr. Miguel Remacha, por guiarme en el mundo de las proteínas P, por su paciencia, dedicación y por tener siempre respuestas brillantes y oportunas a todas mis inquietudes. Gracias a Mari Carmen y a Antonio, por vuestra ayuda y consejos; vosotros sois una parte muy importante del laboratorio.

A mis compañeros del labo CV-310 (Paco, Verónica, Jesús, David, María, Charo y Sandra), gracias por enseñarme tantas cosas en mis inicios en Madrid y por hacerme sentir una más de vosotros. Especialmente quiero agradecer a Vero por la inmensa mano que me echaste en la distancia y a Charo por todo lo que me has ayudado desde el día uno de mi llegada hasta la actualidad. A mis segundos compañeros del 103 (Tomás, Jael, Ana y

Marina), por darle un nuevo aire al laboratorio. A Marina gracias por tus consejos sobre el mundo de las parejas y la convivencia. A todos los polluelos que dieron sus primeros pasos en el laboratorio (Marina, Lidia, Silvia, Blanca) en especial a Álvaro y a Miriam, gracias por enseñarme a que la escritura de una tesis doctoral se puede compaginar con muchas cosas; la experiencia de acompañaros en la aventura de una tesis de Máster fue muy gratificante, os deseo muchísima suerte en el mundo de la ciencia y ya sabéis no desesperéis, recordar siempre “tranquilo boby, tranquilo”.

A Ana, porque desde el día que te conocí has sido un apoyo en los momentos buenos y en los no tan buenos, extendiendo mi agradecimiento a tu familia por abrirme un huequito en sus corazones y en navidad hacerme sentir en familia, Gracias.

No me pudo olvidar de todas las personas del CBM (especialmente mis compañeros de los laboratorios 102, 106 y 109) con los que entre risas, charlas, consejos y comentarios, llenaron cada uno de mis días.

Gracias al Laboratorio 321 y especialmente a Javier por orientarme y guiarme en el mundo de las mitocondrias.

Al Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” y a todooooooooooooo los servicios que los componen, nada de esto hubiese sido posible sin una casa como esta.

Un agradecimiento muy especial a Luis Alberto y Susana, amigos incondicionales, sin ustedes mi estancia en Madrid hubiese sido muy dura.

Y a ti David por haberme escogido, por esperarme y por tu inmensa paciencia; llegastes del lugar menos esperado y en el momento más difícil de todo el doctorado para darle un nuevo sentido a esta aventura... “la vida”. Me siento afortunada por tenerte a mi lado.

Índices

Índice General

SUMMARY	Xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 LA TRADUCCIÓN	3
I.1.1 El ribosoma	3
I.1.2 El tallo ribosómico	4
I.1.3 El tallo ribosómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
I.1.3.1 La proteína P0	6
I.1.3.2 Las proteínas ácidas P1/P2	6
I.1.3.3 Interacción de los componentes del tallo ribosómico	8
I.1.3.4 Mutantes del tallo ribosómico de <i>S. cerevisiae</i>	9
I.1.3.5 Papel regulador del tallo	10
I.1.4 Función extraribosómica de las proteínas ribosómicas	11
I.2 LA ESPORULACIÓN	13
I.3 LA MITOCONDRIA	17
I.3.1 Genes mitocondriales	17
I.3.1.1 El ADN mitocondrial	17
I.3.1.2 Genes nucleares que codifican componentes mitocondriales	18
I.3.2 Las mitocondrias como productoras de energía	18
I.3.3 Mantenimiento de la integridad mitocondrial	19
I.3.4 El fenotipo <i>petite</i>	20
I.4 LA ESPORULACIÓN Y LA RESPIRACIÓN	21
II. OBJETIVOS	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27

III.1 MATERIAL BIOLÓGICO	29
III.1.1 Cepas de <i>Eschericia coli</i>	29
III.1.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
III.2 PLÁSMIDOS	32
III.3 MEDIOS DE CULTIVO	32
III.3.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	32
III.3.2 Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	33
III.3.3 Diferenciación de células con metabolismo respiratorio	33
III.3.4 Inducción de la esporulación en <i>S. cerevisiae</i>	33
III.4 ENZIMAS Y REACTIVOS	34
III.5 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	34
III.5.1 Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	34
III.5.2 Obtención de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i>	35
III.5.3 Extracción de ADN plasmídico incorporado a <i>S. cerevisiae</i>	35
III.5.4 Obtención de fragmentos de ADN mediante PCR	35
III.5.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	35
III.5.6 Extracción de ARN total de levaduras	36
III.5.7 Síntesis de cDNA	36
III.6 OLIGONUCLEÓTIDOS	36
III.7 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR	37
III.7.1 Transformación de <i>E. coli</i>	37
III.7.2 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	37
III.8 DISRUPCIÓN GÉNICA	37
III.9 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS	38
III.9.1 Electroforesis de ADN	38
III.9.2 Electroforesis de proteínas	38
III.9.3 Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana	38
III.10 OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE <i>S. cerevisiae</i>	39
III.10.1 Obtención de extracto total mediante lisis alcalina	39

III.10.2 Obtención de extracto total citoplasmático (S30)	40
III.10.3 Obtención de la fracción citoplasmática libre de ribosomas (S100) y la fracción de ribosomas	40
III.11 PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS Y SUBFRACCIONES MITOCONDRIALES	41
III.11.1 Obtención de mitocondrias con alto grado de pureza	41
III.11.2 Fraccionamiento mitocondrial	42
III.11.3 Extracción de ADN mitocondrial	43
III.11.4 Purificación de ribosomas mitocondriales	43
III.11.5 Identificación de proteínas asociadas a mitocondria	44
III.12 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA MITOCONDRIAL	44
III.12.1 Aislamiento de mitocondrias activas	44
III.12.2 Ensayo de actividad respiratoria mitocondrial	45
III.13 DESINTEGRACIÓN DE COMPLEJOS MITOCONDRIALES	46
III.14 SÍNTESIS <i>in vivo</i> DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	46
III.15 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	47
IV. RESULTADOS	49
IV.1 CONSTRUCCIÓN DE CEPAS D45 Y D67 EN EL FONDO GENÉTICO SK1	51
IV.2 ANÁLISIS DE LA ESPORULACIÓN EN LOS DOBLES MUTANTES DD45 Y DD67	54
IV.2.1 Segregación nuclear durante la esporulación	55
IV.3 LOS DOBLES MUTANTES DD45 Y DD67 Y EL FENOTIPO <i>petite</i>	57
IV.4 OBTENCIÓN DE UN MUTANTE D45 <i>grande</i>	58
IV.4.1 Obtención del mutante D45 por esporulación/germinación	58
IV.4.2 Obtención del mutante D45 mediante transformación	59
IV.4.3 Obtención de un mutante condicional D45 (D45dGP5)	60
IV.5 LA AUSENCIA DE LAS PROTEÍNAS P2 Y EL DEFECTO EN LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL	62
IV.5.1 Conversión del mutante condicional D4 <i>grande</i> en D45 <i>petite</i>	62
IV.5.2 Actividad respiratoria de las mitocondrias en ausencia de las proteínas P2	65
IV.5.3 Caracterización del fenotipo <i>petite</i> mutante D45	67

IV.5.3.1 El fenotipo <i>petite</i> no revierte	67
IV.5.3.2 Los mutantes D45 son p^-	68
IV.5.3.3 El ADN mitocondrial	69
IV.5.3.4 Síntesis de proteínas mitocondriales. Detección de Cox2	70
IV.5.4 Caracterización de las mitocondrias del D45	72
IV.5.4.1 Aislamiento de mitocondrias y comprobación de su pureza	72
IV.5.4.2 Los mutantes D45 acumulan P0 en la mitocondria	72
IV.5.4.3 La presencia de P0 en las mitocondrias es ocasionada por la ausencia de las proteínas ácidas	74
IV.5.4.4 La sobreexpresión de P0 la dirige a mitocondrias	75
IV.5.4.5 Compartimentalización de P0 en las mitocondrias	78
IV.5.5 Búsqueda de genes relacionados con la alta tasa de D45 <i>petite</i> en SK1	82
IV.6 OBTENCIÓN DE UN MUTANTE D67 COMPETENTE EN RESPIRACIÓN	84
IV.7 ANÁLISIS DE LA ESPORULACIÓN EN LOS MUTANTES SIN PROTEÍNAS P ASOCIADAS AL RIBOSOMA	85
IV.7.1 La esporulación en ausencia de las proteínas P1	85
IV.7.2 La esporulación en ausencia de las proteínas P2	86
IV.7.3 Las proteínas ácidas libres o asociadas al tallo y su relación con la esporulación.	87
V. DISCUSIÓN	91
IV.1 LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA MITOCONDRIAL REQUIERE DE LAS PROTEÍNAS P	94
IV.2 LOS MUTANTES D45 ACUMULAN P0 EN LA MITOCONDRIA	97
IV.3 EN AUSENCIA DE LAS PROTEÍNAS P DEL TALLO RIBOSÓMICO NO SE DESARROLLA LA ESPORULACIÓN	98
VI. CONCLUSIONES	103
VII. BIBLIOGRAFÍA	107
VIII. ABREVIATURAS	121

Índice de figuras

Figura I.1 Ribosoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Figura I.2 Regulación traduccional mediada por el tallo ribosómico	11
Figura I.3 Regulación transcripcional de la esporulación	17
Figura IV.1 Módulos de reemplazamiento génico	51
Figura IV.2 Esquema de las etapas seguidas para la construcción de los dobles mutantes heterocigotos d4d5 y d6d7	52
Figura IV.3 Obtención de la cepa d4d5	53
Figura IV.4 Identificación de los clones D45 haploides	54
Figura IV.5 Esporulación en ausencia de P1/P2	54
Figura IV.6 Seguimiento de la segregación nuclear durante la esporulación	55
Figura IV.7 Distribución de las mitocondrias durante la esporulación	56
Figura IV.8 Competencia respiratoria en ausencia de las proteínas P	57
Figura IV.9 Fenotipo <i>petite</i> en los clones haploides de los mutantes D45 y D67	58
Figura IV.10 Mutante D45 <i>petite</i> por esporulación/germinación	59
Figura IV.11 Obtención de un mutante D45 <i>petite</i> por transformación	60
Figura IV.12 Esquema del proceso seguido para la obtención del mutante D45 condicional (D45dGP5)	61
Figura IV.13 Crecimiento del mutante condicional (D45dGP5) con diferentes fuentes de carbono	62
Figura IV.14 Esquema del seguimiento de la conversión del mutante D45dGP5 <i>grande</i> en mutante D45 <i>petite</i>	63
Figura IV.15 Conversión del mutante condicional D45dGP5 en mutante D45	64

Figura IV.16 Actividad respiratoria mitocondrial del mutante D45dGP5 a medida que se convierte en D45	66
Figura IV.17 El fenotipo <i>petite</i> no revierte por reexpresión de las proteínas P1/P2	67
Figura IV.18 Daño del genoma mitocondrial en el mutante D45	68
Figura IV.19 Cambios en el ADN mitocondrial en los mutantes D45	69
Figura IV.20 Fallo en la traducción mitocondrial en los mutantes D45	70
Figura IV.21 Alteración en el flujo de la información genética mitocondrial en ausencia de las proteínas P	71
Figura IV.22 Pureza de las mitocondrias	72
Figura IV.23 Acumulación de P0 en las mitocondrias	73
Figura IV.24 Diferencias de P0 en las mitocondrias de los mutantes D45	74
Figura IV.25 La reexpresión de las proteínas P2 impiden la acumulación de P0 en las mitocondrias	74
Figura IV.26 Acumulación de P0 en las mitocondrias de diferentes mutantes del tallo	75
Figura IV.27 Construcción de la cepa dGP0	77
Figura IV.28 P0 en mitocondrias de células de fondo genético SK1 con el tallo desnudo	78
Figura IV.29 Localización submitocondrial de P0	79
Figura IV.30 Fraccionamiento mitocondrial	80
Figura IV.31 Purificación de ribosomas mitocondriales	81
Figura IV.32 Complejos de P0 dentro de la mitocondria	82
Figura IV.33 Genotipo dominante del mutante D45 del fondo genético W303	83
Figura IV.34 Esporulación del mutante DD67	85
Figura IV.35 Esporulación del mutante DD45	88
Figura IV.36 Esporulación en presencia de proteínas P citoplasmáticas, no unidas a los 80S	89

Índice de tablas

Tabla I.1 Proteínas ribosómicas con funciones extraribosómicas	12
Tabla III.1 Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	29
Tabla III.2 Plásmidos	32
Tabla III.3 Oligonucleótidos	36
Tabla III.4 Anticuerpos empleados para la detección inmunológica de proteínas transferidas a membranas	38

Summary

The stalk is a lateral protuberance of the large subunit of the ribosome. In *Saccharomyces cerevisiae* the stalk is formed by a central protein called P0 and four accessory proteins, two of the P1 type (P1 α , P1 β) and two of the P2 type (P2 α and P2 β). The P1 and P2 proteins bind as heterodimers P1 β /P2 α and P1 α /P2 β to the P0 protein, which in turn interacts with the 25S rRNA through its amino terminal end. Although the basic function of the stalk is promoting the interaction of translation factors during the protein synthesis, a regulatory role has also been proposed for it, so that different populations of ribosomes, with different stalk composition, are responsible for the differential translation of some mRNAs in the cell. Among the stalk components, only P0 protein is essential. Mutants in P1 and P2 proteins are viable; however, there are conditions in which P1 and P2 proteins are essential for the yeast cells. As an example, mutants without P2 or P1 are unable to sporulate, being this phenotype reverted with the expression of any P1/P2 heterodimers. For further studying how the absence of the P1 and P2 proteins affects the process of sporulation, mutants without protein P1 (called D67) or P2 protein (mutant called D45) have been constructed in the SK1 genetic background. A common feature between D45 and D67 mutants is that they do not have associated P proteins to the stalk; differentially, ribosome unbound P2 proteins accumulate in D67 while non P protein is detected in D45. It has been confirmed that in the absence P proteins, these mutants do not develop the sporulation process. In addition, these mutants showed defects when grown in a media with non-fermentable carbon sources, which reflects a defect in mitochondrial function. D45 mutant was not able to grow at all under strict respiratory conditions, thus behaving as a *petite* strain; mitochondria characterization showed a severe alteration in the mitochondrial DNA and a remarkable intramitochondrial accumulation of P0 protein. On the contrary, it is possible to obtain a respiratory competent D67 mutant, although it is true that the frequency of spontaneous *petite* formation is much higher than in the wild type strain. Sporulation and respiration are two interlaced processes that are affected independently by the absence of P proteins free in the cytoplasm. These results suggest a potential extraribosomal role of the P1 and P2 proteins in the cells.

I. *Introducción*

I.1 LA TRADUCCIÓN

La traducción o síntesis de proteínas es la última etapa del proceso de expresión génica, donde la información contenida en los ARNm es convertida en proteínas. El ribosoma, el ARNm, los ARNt y una gran cantidad de proteínas solubles que actúan como factores de traducción, forman una compleja maquinaria en uno de los procesos más conservados en la evolución. Debido a la alta complejidad y al gran gasto energético invertido por la célula, éste es uno de los mecanismos mas regulado en los organismos eucariotas [Chakraborty, 2001].

I.1.1 El ribosoma

La partícula ribosómica es la maquinaria central en el proceso de traducción ya que lleva a cabo tres funciones básicas: 1.- Selecciona y une los ARNt al ARNm, monitoreando el apareamiento entre el codón y el anticodón; 2.- Cataliza la transferencia y formación del enlace peptídico entre el péptido naciente (unido al ARNt en el sitio P) y el aminoácido entrante (unido al ARNt en el sitio A) y 3.- Participa en la translocación, proceso en el cual el ARNt desacetilado en el sitio A se mueve al P y el ARNm avanza un codón en dirección 3' [Ramakrishnan, 2002; Spirin, 2002; Moore y Steitz, 2003]. La morfología general de los ribosomas es similar en bacterias, eucariotas y arqueas [Nilsson *et al.*, 2007]. Están compuestos por un esqueleto de ARN ribosómico (ARNr) sobre el que se disponen las proteínas, rellenando los huecos y dando estabilidad a la estructura.

En células eucariotas los ribosomas presentan un coeficiente de sedimentación 80S y las dos subunidades que los componen de 40S y 60S. La subunidad mayor (60S) está compuesta por tres moléculas de ARNr (28S, 5,8S y 5S) y aproximadamente 46 proteínas, mientras que la subunidad menor (40S) contiene el ARNr 18S y 32 proteínas [Mager *et al.*, 1997; Planta y Mager, 1998]. La subunidad 40S es responsable de la unión y decodificación del ARNm, y la subunidad 60S contiene el sitio peptidil-transferasa responsable de la formación del enlace peptídico [Doudna y Rath, 2002].

A pesar de que los ribosomas son partículas altamente conservadas en todos los organismos y que la estructura cristalográfica del ribosoma de *Escherichia coli* se conoce desde hace ya algún tiempo [Spahn *et al.*, 2001; Spahn *et al.*, 2004], en *Saccharomyces cerevisiae* solo hasta el pasado año fue posible obtener la estructura cristalográfica con una

resolución de 4,15Å, la cual revela la elevada complejidad del ribosoma eucariota [Ben-Shem *et al.*, 2010] (Figura I.1).

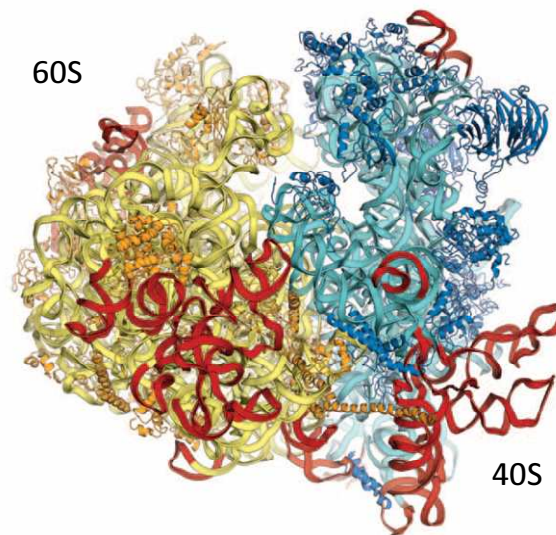


Figura I.1 Ribosoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Estructura cristalográfica del ribosoma de *S. cerevisiae* con una resolución de 4,15Å; las proteínas y el ARNr en la subunidad 40S están coloreados en azul oscuro y claro, respectivamente y en tonos amarillos (oscuro y pálido, respectivamente) en la subunidad 60S [Ben-Shem *et al.*, 2010].

I.1.2 El tallo ribosómico

Una característica estructural particular de la subunidad 60S es que contiene una protuberancia lateral de naturaleza únicamente proteica, con una alta flexibilidad, llamada tallo ribosómico [Bielka, 1982]. Esta estructura fue inicialmente descrita en ribosomas de *E. coli* [Strycharz *et al.*, 1978]; no obstante, se encuentra presente en los ribosomas de todos los organismos conocidos.

El tallo es la única estructura del ribosoma que presenta elementos proteicos que interaccionan entre sí, sin la intervención del ARNr [Ban *et al.*, 2000]. Está formado por una proteína central de carácter hidrofóbico llamada P0 en eucariotas (ó L10 en procariotas), rodeada por un grupo de proteínas de menor tamaño, de carácter muy ácido (de ahí que comúnmente se les llame proteínas ácidas), denominadas P1/P2 en eucariotas (ó L7/L12 en procariotas). La proteína P0 (ó L10) interacciona con las proteínas P1/P2 (ó L7/L12) y con el centro GTPasa del ARNr 28S (ó 23S) y todos estos componentes forman el tallo ribosómico [Diaconu *et al.*, 2005].

La composición y estequiometría de los componentes del tallo puede variar dependiendo del organismo. En procariotas, inicialmente se estableció que el tallo estaba compuesto de cuatro copias de la proteína L7/L12 [Subramanian, 1975; Koteliansky *et al.*, 1978] en forma de dos dímeros unidos a la región C-terminal de la proteína L10 [Griaznova y Traut, 2000]. Sin embargo, recientemente se ha descrito en bacterias termófilas [Diaconu *et al.*, 2005; Ilag *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 2008] y en archeas [Maki *et al.*, 2007] una diferente composición del tallo procariótico que corresponde a un complejo heptamérico L10-(L7/L12)₆.

En el caso de organismos eucariotas, la composición del tallo es más compleja puesto que las proteínas ácidas han evolucionado hacia dos tipos o familias, P1 y P2 [Wool *et al.*, 1991], y en plantas existe un tercer tipo adicional llamado P3 [Bailey-Serres *et al.*, 1997; Szick *et al.*, 1998]. Además, el número de proteínas ácidas en cada una de las familias varía entre los diversos organismos eucariotas siendo uno en humanos [Rich y Steitz, 1987], rata [Wool *et al.*, 1991] e invertebrados como *Artemia salina* [van Agthoven *et al.*, 1978] y *Drosophila melanogaster* [Wigboldus, 1987]; dos *S. cerevisiae* [Remacha *et al.*, 1988; Beltrame y Bianchi, 1990; Newton *et al.*, 1990] y más de dos en *Trypanosoma cruzi* [Levin *et al.*, 1993]. En general se puede considerar que la composición del tallo eucariótico corresponde a un complejo pentamérico formado por cuatro copias de proteínas P1/P2 y una molécula de la proteína P0, aunque existe una variabilidad en la composición relativa de las proteínas P dependiendo del organismo eucariota y del estado metabólico de la célula.

La función del tallo se ha relacionado con la interacción con los factores de traducción en el centro GTPasa del ribosoma, durante la síntesis de proteínas [Strycharz *et al.*, 1978; Marquis *et al.*, 1981; Wahl y Moller, 2002; Diaconu *et al.*, 2005; Helgstrand *et al.*, 2007]. Así, se ha comprobado mediante microscopía electrónica que el tallo está situado en el sitio de entrada de los factores de elongación, tanto en *E. coli* [Stark *et al.*, 1997], como en *S. cerevisiae* [Gomez-Lorenzo *et al.*, 2000]. En ribosomas de *S. cerevisiae*, se ha demostrado una evidente conexión entre el tallo y el factor de elongación 2 (eEF-2) [Gomez-Lorenzo *et al.*, 2000; Spahn *et al.*, 2004], al igual que sucede en los ribosomas de *E. coli* con los factores de elongación EF-Tu y EF-G [Agrawal *et al.*, 2000]. El tallo podría, por tanto, jugar un papel relevante en la síntesis de proteínas estabilizando la unión de los factores de traducción con el ribosoma [Moller *et al.*, 1983; Bargis-Surgey *et al.*, 1999; Lalioti *et al.*, 2002; Rawat *et al.*, 2003].

I.1.3 El Tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*.

I.1.3.1 La proteína P0.

P0 tiene un peso molecular de 32 KDa, un punto isoeléctrico de 4,56, una longitud de 312 aminoácidos y no se encuentra libre en el citoplasma. Es la única proteína del tallo que es esencial [Santos y Ballesta, 1994], constituyendo la parte mínima indispensable para el funcionamiento de los ribosomas; de esta forma los ribosomas que solo contienen P0 pueden realizar la síntesis de proteínas, pero a una tasa inferior que aquellos con un tallo completo [Remacha *et al.*, 1995a].

En *S. cerevisiae* se han descrito varios dominios funcionales en esta proteína. Los primeros 121 aminoácidos constituyen el dominio N-terminal y esta región es la responsable de la unión de la proteína al ARNr 26S [Santos y Ballesta, 2005]. El siguiente dominio, comprendido entre los aminoácidos 118 y 138, parece estar implicado en la interacción con eEF-2 y es responsable de la resistencia a antifúngicos derivados de sordarina [Santos *et al.*, 2004]. Existe un tercer dominio implicado en la unión de las proteínas P1/P2 delimitado por los aminoácidos 199 y 258 [Perez-Fernandez *et al.*, 2005; Krokowski *et al.*, 2006; Cárdenas, 2008], le sigue una región muy flexible rica en alaninas entre los aminoácidos 265 y 290 que funciona como bisagra, por último el extremo carboxilo, correspondiente a los últimos 21 aminoácidos [Santos y Ballesta, 1995]. Esta región presenta una elevada homología con el extremo C-terminal de las proteínas ácidas, en especial la secuencia terminal DMGFGLFD está implicada en la interacción con los factores de traducción y, en última instancia, es responsable del funcionamiento del ribosoma y de la viabilidad celular en ausencia de las proteínas ácidas [Santos *et al.*, 2004].

I.1.3.2 Las proteínas ácidas P1/P2

a). Generalidades y estructura

En levaduras se han descrito cuatro proteínas ácidas, dos del tipo P1 (P1 α y P1 β) y dos del tipo P2 (P2 α y P2 β) [Remacha *et al.*, 1988; Mager *et al.*, 1997]. Las proteínas P1 α , P1 β , P2 α y P2 β , están codificadas por genes independientes, tienen un tamaño de aproximadamente 12 kDa y un punto isoeléctrico entre 3 y 4. Además, presentan una homología de secuencia global del 60%, siendo mayor entre las del mismo tipo: 77,1% entre las P1 y 80,2% entre las P2.

En cuanto a la estructura de las proteínas ácidas, es posible distinguir varias regiones. La región N-terminal es la responsable de la formación de heterodímeros entre ellas, así como de su anclaje al ribosoma a través de P0 [Jose *et al.*, 1995; Tchorzewski *et al.*, 2000a; Zurdo *et al.*, 2000; Briceno *et al.*, 2009, Camargo *et al.*, 2011]. La región central, compuesta por residuos de alanina, glicina y prolina principalmente que confiere flexibilidad a la proteína. Por último, la región C-terminal, como se ha dicho anteriormente, es muy similar a la de P0 y es la responsable de las interacciones con los factores de traducción [Vard *et al.*, 1997; Bargis-Surgey *et al.*, 1999; Lalioti *et al.*, 2002]. De la estructura terciaria de estas proteínas se conoce muy poco, debido a que por la gran flexibilidad que poseen no ha sido posible su cristalización, a diferencia de la L12 de bacterias [Wahl *et al.*, 2000; Bocharov *et al.*, 2004; Diaconu *et al.*, 2005].

Las proteínas ácidas se encuentran fosforiladas en el último residuo de serina cuando se encuentran en el ribosoma (de allí que sean denominadas proteínas P). Algunos datos obtenidos *in vitro* sugerían que esta fosforilación era necesaria para la actividad del ribosoma [Vidales *et al.*, 1984]. Sin embargo, posteriormente se pudo demostrar que, *in vivo*, la sustitución de esta serina por otro aminoácido no fosforilable no altera la capacidad de unión al ribosoma ni la eficiencia en la traducción [Zambrano *et al.*, 1997; Rodríguez-Gabriel *et al.*, 1998]. No obstante, se ha propuesto que la fosforilación de las proteínas ácidas pueda estar relacionada con la regulación del patrón de las proteínas expresadas [Remacha *et al.*, 1995a; Ballesta *et al.*, 1999].

b). Localización de las proteínas P

Ninguno de los componentes ribosómicos, ni el ARNr ni las proteínas, se encuentra usualmente libre en el citoplasma celular. La síntesis de las proteínas ribosómicas es un proceso sujeto a una estricta regulación a varios niveles, desde la transcripción hasta la traducción, en el cual el exceso de proteínas ribosómicas sintetizadas es eficientemente degradado por la célula [Warner, 1989]. Sin embargo, a diferencia del resto de proteínas ribosómicas, las proteínas ácidas sí se encuentran libres formando un reservorio citoplásmico [Sanchez-Madrid *et al.*, 1981; Mitsui *et al.*, 1988; Saenz-Robles *et al.*, 1990]. Además, se ha demostrado que existe un intercambio de las proteínas ácidas entre dicho reservorio y el ribosoma [Zinker, 1980; Remacha *et al.*, 1995a].

c). Función

Los datos disponibles indican que las proteínas ácidas están implicadas en la actividad de los factores de elongación [Sanchez-Madrid *et al.*, 1981], lo cual ha llevado a proponer que estas proteínas juegan el mismo papel que la proteína L7/L12 en bacterias [Moller, 1991]. Sin embargo, al contrario de las proteínas bacterianas, las proteínas ácidas eucarióticas no son esenciales para la función del ribosoma y este hecho, junto con su evolución en dos tipos distintos de proteína, P1 y P2, puede ser una consecuencia de su implicación en un proceso regulatorio de la traducción [Ballesta y Remacha, 1996].

I.1.3.3 Interacción de los componentes del tallo ribosómico

a). Interacción entre las proteínas P

En una cepa silvestre de *S. cerevisiae*, las cuatro proteínas ácidas (P1 α , P1 β , P2 α y P2 β) forman los heterodímeros preferentes P1 α •P2 β , y P1 β •P2 α [Guarinos *et al.*, 2001; Tchorzewski *et al.*, 2003; Francisco-Velilla y Remacha, 2010]. Estos heterodímeros son la forma funcional para interactuar con la proteína P0, permitiendo su unión al ribosoma [Krokowski *et al.*, 2005; Cárdenas, 2008; Francisco-Velilla y Remacha, 2010]. Sin embargo, la formación de cualquier pareja de proteínas P1 y P2 es suficiente para su unión al ribosoma [Remacha *et al.*, 1992]; lo que sugiere que es posible una interacción funcional entre cualquier proteína P1 y P2. No obstante, cuando las cuatro proteínas están presentes, existe una interacción específica entre las proteínas P1 α •P2 β y P1 β •P2 α tanto en el ribosoma [Guarinos *et al.*, 2001] como en el citosol, donde las proteínas P2 ejercen un efecto protector sobre las proteínas P1, ya que en su ausencia las proteínas P1 son degradadas rápidamente [Nusspaumer *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 2011].

En otros sistemas biológicos, donde no hay dos proteínas de cada tipo, también se ha descrito que las proteínas P1/P2 interactúan de manera estable para formar heterodímeros [Tchorzewski *et al.*, 2000b; Gonzalo *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2002; Ayub *et al.*, 2005].

b). Interacción de las proteínas P con P0

Cada una de las proteínas ácidas se encuentra en cantidades similares en la población global de ribosomas [Remacha *et al.*, 1992], existiendo cuatro proteínas por tallo ribosómico [Saenz-Robles *et al.*, 1990] y por ende una copia de cada uno de los subtipos P1 α , P1 β , P2 α y P2 β [Guarinos *et al.*, 2003; Garcia-Marcos *et al.*, 2008].

La unión de las proteínas P al ribosoma, al igual que la dimerización entre ellas, se da a través de su región amino. Se ha descrito que los primeros 49 aminoácidos de P1 α y los primeros 46 aminoácidos de P2 β son necesarios para la formación del heterodímero y la unión al ribosoma [Briceno *et al.*, 2009]. Además, mediante ensayos de doble híbrido, se ha demostrado que para que ocurra la interacción de las proteínas P2 con P0, es indispensable que el extremo amino se encuentre libre [Francisco-Velilla y Remacha, 2010]. Estudios más específicos han definido que P0 posee dos zonas de interacción independientes para los dímeros P1 α •P2 β y P1 β •P2 α en las regiones 199-230 y 231-258 respectivamente [Krokowski *et al.*, 2006].

En cuanto al orden en el que los dos heterodímeros se unen a P0, se ha propuesto un modelo de ensamblaje donde el heterodímero P1 α •P2 β , formado en el citoplasma se uniría a P0 en los ribosomas. El complejo trimérico sufriría un cambio conformacional y podría acomodar las proteínas P1 β y P2 α , por separado o formando un heterodímero, para crear la estructura pentamérica completa [Krokowski *et al.*, 2005]; no obstante, estudios más recientes han demostrado que el complejo pentamérico P1 α •P2 β •P0•P1 β •P2 α , se puede ensamblar en el citoplasma previo a su unión al ribosoma [Francisco-Velilla y Remacha, 2010].

I.1.3.4 Mutantes del tallo ribosómico en *Saccharomyces cerevisiae*

El papel individual de cada una de las cuatro proteínas ácidas (P1 α , P1 β , P2 α y P2 β) ha sido estudiado mediante interrupción génica. Ninguna de las cuatro proteínas ácidas es esencial para el crecimiento celular, y consecuentemente para la actividad del ribosoma. Sin embargo, la inactivación independiente de cada gen produce un efecto diferente sobre el crecimiento celular [Remacha *et al.*, 1990; Remacha *et al.*, 1992]. Estos resultados sugirieron una especificidad en la función de cada proteína, la cual no puede ser efectuada por ninguna de las otras proteínas P restantes presentes en el reservorio citoplásmico [Ballesta y Remacha, 1996].

La disrupción simple de cada uno de los genes que codifican las proteínas ácidas, así como la combinación de dos o más disrupciones (hasta obtener un cuádruple), ocasiona un aumento en el tiempo de generación de estas cepas mutantes, el cual varía dependiendo de las proteínas que falten [Remacha *et al.*, 1990; Ballesta *et al.*, 1999]. En las cepas mutantes simples (D4, D5, D6 y D7) y en las dobles en las que se elimina una proteína P1 y una P2, el tiempo de generación no varía demasiado con respecto a las cepas silvestres. Por el contrario,

los dobles mutantes que carecen de las dos proteínas P2 ó P1 (D45 y D67 respectivamente), así como los triples y el cuádruple mutante, presentan un incremento considerable del tiempo de generación. Todas estas cepas tienen en común que al expresar sólo proteínas del tipo P1 ó P2, éstas no son capaces de unirse al ribosoma, por lo que el tallo sólo contiene la proteína P0; de esta manera se reduce la actividad GTPasa dependiente de eEF-2 y, por tanto, la síntesis de proteínas [Remacha *et al.*, 1992; Remacha *et al.*, 1995a].

A pesar de ser viables, existen situaciones en las que los distintos mutantes presentan un fenotipo claramente diferenciado: así, las cepas D45 y D67 diploides son incapaces de esporular [Remacha *et al.*, 1995a], son sensibles a alta sal o a altas temperaturas [Guarinos, 1999], ó muestran distinta sensibilidad a antibióticos [Krokowski *et al.*, 2007].

I.1.3.5 Papel regulador del tallo

El mutante cuádruple D4567 muestra notables diferencias cuando su patrón de proteínas expresadas es comparado con el de la cepa silvestre mediante electroforesis bidimensional. La expresión de un número de proteínas está notablemente reducida o suprimida, pero otras proteínas se expresan en mayor cantidad en esta cepa. Algunas de las proteínas que están particularmente aumentadas en el mutante cuádruple [Remacha *et al.*, 1995b] parecen corresponder a algunas proteínas de choque térmico que están expresadas preferentemente en células en fase estacionaria [Fuge *et al.*, 1994]. Este cambio en el patrón de expresión proteica podría explicar alguna de las características fenotípicas descritas anteriormente en estas cepas.

En resumen, se ha propuesto un sistema de regulación dependiente de la composición del tallo ribosómico (Figura I.2), donde los ribosomas desprovistos de proteínas ácidas pueden participar en la síntesis proteica normal, pero traducen subpoblaciones de ARNm con diferente eficiencia, o más alta o más baja que los ribosomas con una dotación completa de proteínas ácidas, resultando así en un patrón distinto de las proteínas expresadas y por consiguiente, pudiendo afectar algunas rutas metabólicas [Ballesta *et al.*, 1999]. Es importante resaltar que en una cepa silvestre existen ribosomas con diferentes composición del tallo [Guarinos *et al.*, 2003] lo que da sentido a este modelo de regulación.

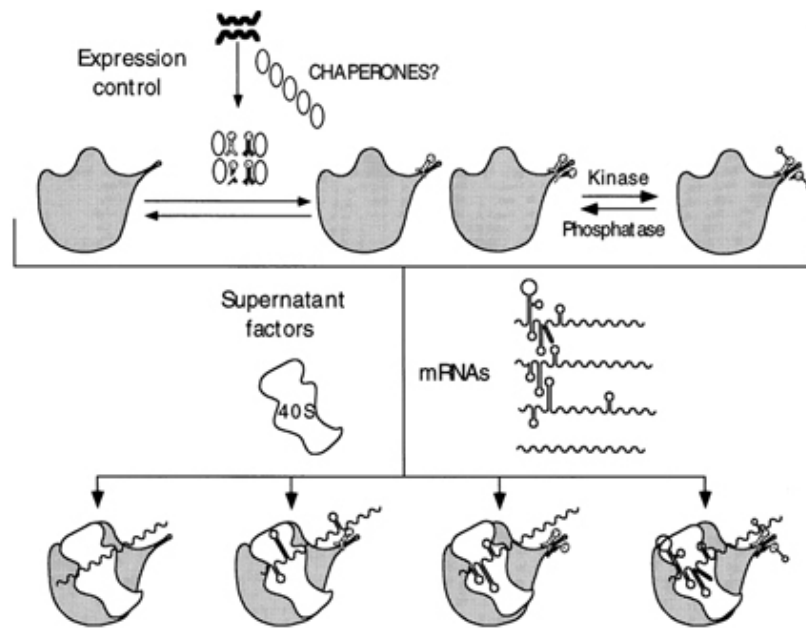


Figura I.2 Regulación traduccional mediada por el tallo ribosómico. Las células contienen una población de subunidades 60S heterólogas, con diferentes cantidades de proteínas P, las cuales están en equilibrio con el reservorio citoplasmático. Todos los tipos de subunidades participan en la traducción, pero traducen con diferente eficiencia los distintos ARNm de la célula. De esto dependerá la diferencia en el patrón de proteínas expresadas [Ballesta *et al.*, 1999].

I.1.4 Función extrarribosómica de las proteínas ribosómicas

Las proteínas ribosómicas son proteínas con capacidad de unión al ARN presentes en las células de todos los organismos; debido a la abundancia de las moléculas de ARN en las células y a su gran variabilidad de tipos, no es descabellado pensar que estas proteínas pueden cumplir con otras funciones auxiliares en las células. Las primeras evidencias que señalan a una proteína ribosómica con función extrarribosómica fueron descritas en *E. coli*, donde se observó que la proteína S1 estaba implicada en la replicación del bacteriófago Q β , actuando posiblemente como una replicasa del ARN que constituye el genoma de este bacteriófago [Blumenthal y Carmichael, 1979; Wool, 1996].

Para definir que una proteína ribosómica posee funciones extrarribosómicas, Warner y McIntosh (2009) establecieron 3 criterios fundamentales: (1) demostrar que las proteínas ribosómicas interactúan específicamente con componentes no ribosómicos de la célula, (2) que estas interacciones ocasionan cambios fisiológicos y (3) que estas interacciones ocurren sin implicación de los ribosomas. De acuerdo con estos 3 criterios se han descrito varias proteínas ribosómicas con funciones extrarribosómicas resumidas en la tabla I.1.

Tabla I.1 Proteínas ribosómicas con funciones extraribosómicas. Tomado de [Warner y McIntosh, 2009].

PROTEÍNA RIBOSÓMICA	FUNCIÓN EXTRARIBOSÓMICA
Reclutamiento de bacteriófagos	
S1	Replicasa Q β
S10, S4	Complejo NUS; antiterminación
Autorregulación de la síntesis de proteínas ribosómicas (procariontas)	
L4	Inhibe la traducción de ARNm policistrónicos
L4	Inhibe la transcripción del operón de S10
L4	Interactúa e influye sobre actividad de la RNasa E
Autorregulación de la síntesis de proteínas ribosómicas (eucariotas)	
L30 (<i>S. cerevisiae</i>)	Inhibe el <i>Splicing</i> de su ARNm
S14 (<i>S. cerevisiae</i>)	Inhibe el <i>Splicing</i> de su ARNm
L2 (<i>S. cerevisiae</i>)	Acorta la vida media de su ARNm
S28 (<i>S. cerevisiae</i>)	Acorta la vida media de su ARNm
L12 (<i>C. elegans</i>)	Inhibe el <i>Splicing</i> de su ARNm
S13 (<i>H. sapiens</i>)	Inhibe el <i>Splicing</i> de su ARNm
Vigilantes de la biosíntesis de los ribosomas (mamíferos)	
L5, L11, L23, S7	Secuestra HDM2/MDM2
L11	Secuestra <i>c-myc</i>
L26	Promueve la traducción de p53
L23	Secuestra la nucleoplasmina de Miz1
Verdaderas funciones extraribosómicas	
L7 (archeas)	Complejo SnoRNP
RACK1	Señalización celular
L13a (<i>H. sapiens</i>)	Inhibe la traducción de ARNm
S3 (<i>H. sapiens</i> y <i>D. melanogaster</i>)	Endonucleasa
S3 (<i>H. sapiens</i>)	Une NF κ B
L10 (<i>A. thaliana</i>)	Antiviral
L10 (<i>H. sapiens</i>)	Une <i>c-jun</i>
Otras funciones interesantes (mamíferos)	
S20 (<i>S. cerevisiae</i>)	Influye en la transcripción de la Polimerasa III
L6 (<i>S. cerevisiae</i>)	Influye en la transcripción de la Polimerasa III
L22 (<i>D. melanogaster</i>)	Une la histona H1
L22 (<i>H. sapiens</i>)	Se une al ARN del Virus de Epstein-Barr
S26 (<i>H. sapiens</i>)	Susceptibilidad a la diabetes

Muchas de las proteínas ribosómicas poseen funciones conocidas relacionadas con el sistema traduccional, ya sea regulando sus propios niveles de expresión o el de otras proteínas ribosómicas en la célula (L30, S14 y S28 de *S. cerevisiae* y L4 de *E. coli*), o

controlando el complicado ensamblaje de los ribosomas (L5, L11, L23 y S7) [Warner y McIntosh, 2009]. No obstante existen verdaderas funciones extrarribosómicas atribuidas a proteínas ribosómicas. Algunos ejemplos son: L4 de *E. coli* actúa como moduladora de la actividad de la RNasa E durante la respuesta a estrés [Singh *et al.*, 2009], L7 en Archaeas interviene en el procesamiento de los ARNr [Kuhn *et al.*, 2002], L13a en humanos inhibe la traducción de algunos ARNm [Mazumder *et al.*, 2003], S3 en *D. melanogaster* y humanos posee actividad endonucleasa [Wilson *et al.*, 1994] y L10 en *Arabidopsis thaliana* actúa en la defensa antiviral [Carvalho *et al.*, 2008; Warner y McIntosh, 2009].

A las proteínas del tallo ribosómico también se le han atribuido funciones extrarribosómicas. Las primeras evidencias señalaron a P0, como una endonucleasa apurínica/apirimidínica [Yacoub *et al.*, 1996], posteriormente se describió como una proteína envuelta en la expresión de genes [Frolov y Birchler, 1998], ambas funciones en *D. melanogaster*.

Aunque no podrían ser consideradas como verdaderas funciones extrarribosómicas, las proteínas ácidas han sido relacionadas con algunas enfermedades; tal es el caso de P0, que se ha descrito como un autoantígeno asociado al *Lupus erythematosus* neuropsiquiátrico [Elkon *et al.*, 1985; Kiss y Shoenfeld, 2007], y también se ha relacionado con el cáncer colorectal [Barnard *et al.*, 1992] y cáncer de pecho [Marzocchella *et al.*, 2011]. Un dato reciente señala a las proteínas P como potenciales biomarcadores de la progresión del cáncer; en pacientes con cáncer de pecho es posible detectar anticuerpos contra P0, mientras que en pacientes con lesiones benignas, solo se han detectado anticuerpos contra las proteínas P1 y P2. La presencia de estos anticuerpos contra las proteínas P, estaría indicando una desregulación del ciclo celular en las células mamarias [Marzocchella *et al.*, 2011].

I.2 LA ESPORULACIÓN

Las levaduras son microorganismos unicelulares que en presencia de cantidades apropiadas de nutrientes se multiplican mediante gemación, tanto en su fase haploide como diploide. Este tipo de crecimiento consiste en sucesivas divisiones mitóticas, donde la célula hija recibe la misma carga genética de la madre. La ausencia de nutrientes provoca distintas respuestas celulares que desencadenan otros procesos de división celular. Así, en medios con ausencia completa de nitrógeno y en presencia de una fuente de carbono no fermentable

(como acetato), las células diploides ($2n$) abandonan el ciclo de crecimiento mitótico y entran en meiosis, originando 4 células hijas con la mitad de la carga genética de la madre (células haploides, $1n$), en el proceso denominado esporulación [Neiman, 2005].

Cuando una célula entra en esporulación sufre una simple ronda de replicación del ADN (fase S premeiótica). Durante la Profase meiótica I, los cromosomas homólogos experimentan altas tasas de recombinación; seguidamente, los cromosomas homólogos se aparean y posteriormente se segregan durante la meiosis I. Sin que exista una nueva ronda de replicación del ADN, las cromátidas hermanas se separan (meiosis II) dando origen a 4 núcleos con la mitad de la carga genética de la célula madre [Piekarska *et al.*, 2010]. A diferencia de la meiosis del resto de células eucariotas, las levaduras deben realizar un empaquetamiento especializado de cada uno de los 4 núcleos haploides dentro de una espora. Estos dos procesos, meiosis y morfogénesis de la espora, se encuentran superpuestos por lo que requieren la expresión coordinada de genes tanto meióticos como de esporulación para garantizar tanto el nivel como el tiempo de expresión génica apropiados [Vershon y Pierce, 2000; Piekarska *et al.*, 2010].

Los mayores avances en el estudio de la esporulación en *S. cerevisiae* se han obtenido empleando microarrays de ARN; con los cuales se pudo determinar que, de los 6200 genes que codifican proteínas en el genoma de levaduras, más de 1000 genes muestran cambios significativos en los niveles de sus ARNm durante la esporulación. La mitad de ellos se encuentran inducidos y la otra mitad reprimidos [Chu *et al.*, 1998]. Según el momento en el que se inducen estos genes han sido clasificados en: tempranos, medios, medios-tardíos y tardíos [Mitchell, 1994; Chu y Herskowitz 1998].

Inducción de los genes Tempranos I: se ha descrito que aproximadamente 62 genes muestran un aumento de su expresión unos 30 minutos después de ser transferidas las levaduras a las condiciones de esporulación. Muchos de estos genes intervienen en la sinapsis de cromosomas homólogos o en la recombinación.

Inducción de los genes Tempranos II: este grupo está constituido por 42 genes que, aunque su función también está relacionada con el apareamiento de los cromosomas y la recombinación, su expresión está ligeramente retardada con respecto al grupo anterior.

Inducción de los genes Tempranos-Tardíos: este conjunto lo componen 95 genes que muestran inducción aproximadamente 2 horas después de transferidas las células a medio de

esporulación. Estos se distinguen de los genes tempranos porque ocurre un incremento adicional de los niveles del transcrito después de 5 a 7 horas de iniciado el proceso de esporulación. Estos genes están implicados en la formación del SPB (Spindle Pole Bodies) que en levaduras es equivalente al huso acromático, así como en la dinámica y comportamiento de las cromátidas.

Inducción de los genes Medios: es el grupo mayoritario y está constituido por 158 genes, los cuales muestran una inducción fuerte entre las 2 y 5 horas después de transferidas las células al medio de esporulación. Sus funciones están relacionadas con el control de la división meiótica y la morfogénesis de la espora.

Inducción de los genes Medio-Tardíos: 61 genes muestran incremento de su actividad entre las 5 y 7 horas después de iniciada la esporulación. Estos genes controlan aspectos de la división meiótica y de la formación de la espora.

Inducción de los genes Tardíos: solo 5 genes se inducen en la etapa final de la esporulación. Su inducción es observada entre las 7 y 11,5 horas después de que las células han entrado en el proceso de la esporulación y los productos de estos genes son necesarios para la maduración de la pared de la espora.

La activación de todos estos grupos de genes, a tiempos específicos y a niveles adecuados, es posible gracias a una cascada de señales que se inicia cuando la levadura recibe la señal de que se encuentra en condiciones de ausencia de glucosa y nitrógeno (Figura 1.3); en este momento se induce la expresión y activación de Ime1 (*Inducer of Meiosis*) [Chu *et al.*, 1998; Piekarska *et al.*, 2010]. La compleja activación de *IME1* también requiere la represión de *RME1* (*Regulator of Meiosis*), lo cual es posible únicamente en células diploides, ya que los productos de los genes *MATa* y *MATα* forman un complejo ($\alpha 1$ - $\alpha 2$) que interacciona con *RME1* previniendo la expresión de este inhibidor de la esporulación [Neugeborn y Mitchell, 1991]. El complejo $\alpha 1$ - $\alpha 2$, también promueve la expresión de *IME1* a través de la expresión de *IME4*, un regulador positivo de *IME1* [Vershon y Pierce, 2000].

Además de la activación transcripcional, Ime1 está regulado post-traduccionamente, de manera que es funcionalmente activo cuando se encuentra en su forma fosforilada, modificación que es llevada a cabo por dos quinasas Rim11 y Rim15 [Rubin-Bejerano *et al.*, 2004]. Ime1 fosforilada (Ime1P) es capaz de unirse a otro controlador transcripcional, Ume6 (*Unscheduled Meiotic Gene Expression 6*) y formar un complejo (Ime1/Ume6) responsable de

la inducción de los genes tempranos I mediante su unión a la secuencia URS (***Upstream Repression Sequence***) presente en la región promotora de todos estos genes [Vershon y Pierce, 2000; Piekarska *et al.*, 2010].

La mayoría de los genes tempranos II no contienen estas secuencias URS, presentando otros elementos que han sido identificados recientemente [Piekarska *et al.*, 2010]. En la expresión de los genes tempranos tardíos interviene otro elemento inductor de los genes tempranos, Ime2. La expresión de *IME2* es estimulada por Ime1 [Yoshida *et al.*, 1990], por lo tanto, la regulación de los genes tempranos se realiza por dos vías, una dependiente de Ime1 y la otra de Ime2 [Piekarska *et al.*, 2010]. Ime2 no solo induce genes tempranos, sino que además promueve la transición de la fase S (premeiótica) a la fase M (meiotica) mediante la fosforilación y activación de *NDT80* [Benjamin *et al.*, 2003]. Ndt80 es un activador transcripcional de los genes medios y de sí mismo. Durante la fase media de la esporulación ocurren dos divisiones meióticas sucesivas y se inicia la formación de la pared de la espora [Chu y Herskowitz, 1998, Friedlander *et al.*, 2006]. El 70% de los genes involucrados en esta etapa contienen elementos conservados que son reconocidos por Ndt80p, el 30% restante no poseen estos sitios de reconocimiento; sin embargo, la inducción de todos ellos es dependiente de Ndt80p, de forma directa o indirecta [Chu *et al.*, 1998; Chu y Herskowitz, 1998].

Una vez que termina la meiosis I, la membrana pro-espora se cierra sobre cada núcleo haploide y lo encapsula junto con material citoplasmático y organelas. La maduración de la espora se completa con la formación de 4 capas que de dentro a fuera son: manosa, β 1,3-glucano, quitosano y ditirosina [Neiman, 2005]. El sistema de inducción de estos genes es poco conocido; no obstante ninguno de ellos se induce en ausencia de Ndt80. Por lo tanto, es de esperar que la regulación transcripcional de esta etapa requiera la adición de otros elementos reguladores específicos, que a su vez son regulados por Ndt80 [Chu *et al.*, 1998; Vershon y Pierce, 2000; Piekarska *et al.*, 2010].

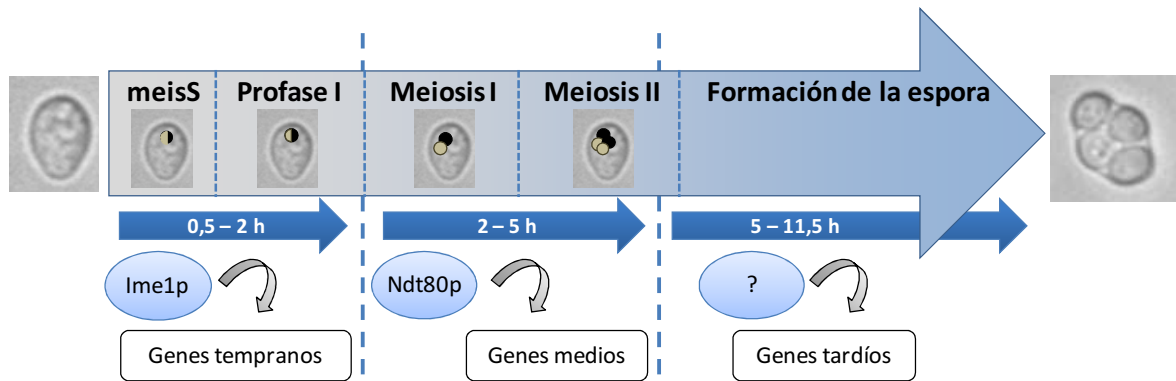


Figura I.3 Regulación transcripcional de la esporulación. Los tres tipos de genes (tempranos, medios y tardíos) son activados por varios factores de transcripción. El primer factor en activarse es el Lme1, seguido por Ndt80; el activador de los genes tardíos sigue siendo desconocido. La figura muestra los tiempos de activación de cada grupo de genes en la cepa Sk1 de *S. cerevisiae* (Adaptado de [Piekarska *et al.*, 2010]).

I.3 LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son organelas citoplasmáticas donde se desarrollan las reacciones necesarias para la producción de energía a través de la respiración [Nelson y Cox, 2000], además de contener enzimas que catalizan pasos claves en una variedad de vías biosintéticas y degradativas [Poyton y McEwen, 1996; Traven *et al.*, 2001] como el metabolismo de carbohidratos y nitrógeno, la oxidación de las lípidos y biosíntesis de hemo en eucariotas superiores, la producción de especies reactivas de oxígeno, la muerte celular programada, la señalización y diferenciación celular, la esporulación en levaduras, entre muchas otras [Scheffler, 2001; Dimitrov *et al.*, 2009].

I.3.1. Genes mitocondriales

La morfogénesis de la mitocondria depende de la expresión de genes tanto mitocondriales como nucleares. En *S. cerevisiae*, de las aproximadamente 750 proteínas requeridas para la función mitocondrial [Sickmann *et al.*, 2003], solo 8 proteínas están codificadas en el genoma mitocondrial, estando el resto codificadas en el genoma nuclear [Dimmer *et al.*, 2002; Ott *et al.*, 2006]; por tanto, el mantenimiento de la integridad mitocondrial depende de una expresión coordinada entre estos dos genomas.

I.3.1.1 El ADN mitocondrial

En levaduras el ADN mitocondrial (ADNmit), es una molécula de ADN circular de 85,5 Kb [Foury *et al.*, 1998], codifica únicamente los dos ARNr (15S y 21S) de los ribosomas

mitocondriales y 8 proteínas [Borst y Grivell, 1978], de las cuales 7 son componentes esenciales de la cadena respiratoria e indispensables para la fosforilación oxidativa: Citocromo *b* del complejo III ó citocromo *c* reductasa; Cox1, Cox2 y Cox3 del complejo IV ó citocromo *c* oxidasa y Atp6, Atp8, y Atp9 de la ATP sintetasa. La octava proteína (Var1) es un componente estructural de la subunidad pequeña del ribosoma [Gruschke *et al.*, 2010]. Estas 8 proteínas mitocondriales son traducidas por los ribosomas mitocondriales y debido a su carácter altamente hidrofóbico, son directamente insertadas en la membrana interna mitocondrial en un proceso que acopla la traducción con la maquinaria de inserción [Ott *et al.*, 2006; Gruschke y Ott, 2010; Ott y Herrmann, 2010].

I.3.1.2 Genes nucleares que codifican componentes mitocondriales

Los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales son necesarios para la función de la mitocondria, encontrándose entre ellos los genes que codifican componentes de la cadena respiratoria (proteínas de los complejos respiratorios y factores de ensamblaje), enzimas mitocondriales, proteínas implicadas en la morfología y herencia de las mitocondrias, componentes vacuolares, la mayoría de los componentes que conforman el sistema de traducción mitocondrial (proteínas mito-ribosómicas y ARNt), las proteínas responsables del mantenimiento del genoma mitocondrial [Lipinski *et al.*, 2010] y proteínas con función desconocida que afectan la actividad de las mitocondrias [Gorsich y Shaw, 2004; Altmann y Westermann, 2005; Merz y Westermann, 2009].

Todas estas proteínas codificadas en el núcleo son sintetizadas por los ribosomas citoplasmáticos e incorporadas a las mitocondrias gracias a que contienen en su región N-terminal una secuencia de transporte mitocondrial [Gruschke y Ott, 2010].

I.3.2 Las mitocondrias como productoras de energía

Las mitocondrias son organelas citoplasmáticas encargadas de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para las funciones celulares en la mayoría de los organismos eucariotas. Los electrones generados por la oxidación de los nutrientes pasan a través de una cadena respiratoria y finalmente son transferidos a moléculas de oxígeno en el proceso de la fosforilación oxidativa. La energía liberada por el paso de electrones genera un potencial de membrana que permite la generación de ATP a partir del ADP [Nelson y Cox, 2000].

La cadena respiratoria, en casi todos los organismos eucariotas, consiste en 5 complejos: complejo I ó NADH deshidrogenasa; complejo II ó succinato deshidrogenasa; complejo III ó citocromo *bc1*; complejo IV ó citocromo *c* oxidasa y complejo Vb ó ATP sintetasa. No obstante, en *S. cerevisiae* el complejo I es sustituido por una NADH deshidrogenasa que es capaz de oxidar NADH exógeno [Merz y Westermann, 2009].

Cuando una fuente de carbono fermentativa como la glucosa está presente en el medio, las levaduras obtienen la energía a través de la fermentación convirtiendo la glucosa en etanol. En esta situación, la transcripción de un gran número de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales está reprimida y la biogénesis de mitocondrias es reducida [Traven *et al.*, 2001]. En el momento en que la glucosa del medio es consumida, se induce la transcripción de genes nucleares que codifican proteínas del aparato traduccional y transcripcional de la mitocondria, además de componentes de la cadena respiratoria; de esta manera las células se adaptan al metabolismo respiratorio. Por tanto, la glucosa ejerce una represión de la actividad respiratoria y de la biogénesis de la mitocondria, independientemente de que el oxígeno esté presente en el medio [DeRisi *et al.*, 1997; Traven *et al.*, 2001].

I.3.3 Mantenimiento de la integridad mitocondrial

Como se ha mencionado anteriormente, en *S. cerevisiae* 7 de las proteínas del complejo respiratorio están codificadas en el ADN mitocondrial y son sintetizadas por los ribosomas mitocondriales; por tanto, la integridad de la mitocondria y su ADN son necesarias para la supervivencia de la levadura en condiciones respiratorias. Incluso se ha descrito que la síntesis de proteínas mitocondrial es necesaria para el mantenimiento de la integridad del ADNmit [Myers *et al.*, 1985]. La estructura y función de las membranas mitocondriales, así como el potencial de membrana, también juegan un papel importante en el mantenimiento de la función de la mitocondria, ya que las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citoplasma celular son transportadas a ésta gracias al gradiente electroquímico [Gasser *et al.*, 1982; Mokranjac y Neupert, 2008; Dimitrov *et al.*, 2009].

Como las mitocondrias no pueden generarse *de novo*, es necesario que las células hijas reciban las mitocondrias de la madre durante la división celular [Gorsich y Shaw, 2004]. La distribución de las mitocondrias durante la mitosis y meiosis está mediada por dos procesos opuestos denominados fusión y fisión mitocondrial. La fusión garantiza la integridad

de las mitocondrias, ya que organelas que se encuentran dañadas, al fusionarse con otras funcionales, pueden recuperar su actividad. La fisión, por su parte, va a permitir la división de las mitocondrias y la herencia de estas organelas a las células hijas [Okamoto y Shaw, 2005].

1.3.3 El fenotipo *petite*

Las levaduras, a pesar de ser organismos aerobios facultativos, muestran distinta dependencia de la función mitocondrial. Así, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de dividirse en ausencia de función respiratoria mitocondrial, (fenotipo que se conoce como *petite* por el pequeño tamaño de las colonias que forman en medios con glucosa como fuente de carbono fermentable [Ephrussi *et al.*, 1949]), otras especies de levaduras como *Kluyveromyces lactis* o *Schizosaccharomyces pombe* (conocidas como *petite* negativos) no son capaces de desarrollarse en estas condiciones. Las alteraciones en la función de las mitocondrias pueden ser ocasionadas por la pérdida parcial del ADN mitocondrial (delecciones que pueden alcanzar del 0,1 al 80% del ADNmit) en levaduras denominadas *rho⁻* (*p⁻*) o por la ausencia completa del ADNmit, también conocidas como *rho0* (*p⁰*) [Goldring *et al.*, 1971; Chen y Clark-Walker, 2000; Contamine y Picard, 2000].

Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* generan *petite* de manera espontánea [Goldring *et al.*, 1971]; la frecuencia con la que surgen espontáneamente colonias *petite* puede variar entre distintas cepas de laboratorios y entre los diferentes fondos genéticos debido a pequeñas variaciones genéticas, que de forma individual podrían o no causar un efecto, pero que cuando se combinan con otros factores ocasionan profundos efectos fenotípicos. Las cepas de *S. cerevisiae* de uso rutinario en el laboratorio presentan una frecuencia de conversión en *petite* bastante mayor a la observada en cepas naturales, posiblemente porque las extensivas propagaciones en el laboratorio en condiciones fermentativas han reducido la selección de cepas con elevada fidelidad en el mantenimiento del genoma mitocondrial [Dimitrov *et al.*, 2009].

Existen además una gran variedad de mutaciones en genes nucleares que ocasionan aumentos en la inestabilidad del ADN mitocondrial y por tanto incrementos en los porcentajes de *petite* en estas cepas; muchos de estos genes se encuentran relacionados directamente con la mitocondria, como por ejemplo aquellos implicados en la síntesis de proteínas mitocondrial [Myers *et al.*, 1985], en el metabolismo del ADN mitocondrial [O'Rourke *et al.*, 2002], en la síntesis de ATP [Contamine y Picard, 2000], o la herencia

mitocondrial (procesos de fusión y fisión mitocondrial) [Gorsich y Shaw, 2004], entre otros. No obstante, otro grupo de genes que codifican proteínas no-mitocondriales conocidas y que están relacionados con diversos procesos celulares como la función vacuolar [Dimmer *et al.*, 2002], la síntesis de ergosterol, el tráfico vesicular [Altmann y Westermann, 2005] o que codifican factores de transcripción nucleares [Dimmer *et al.*, 2002; Dimmer y Rapaport, 2008], también afectan la integridad funcional de la mitocondria por lo que son llamados genes *PET*.

I.4 LA ESPORULACIÓN, LA RESPIRACIÓN Y LAS PROTEÍNAS P

La respiración y la esporulación son dos procesos celulares que en *S. cerevisiae* se encuentran muy relacionados debido a muchos factores. Por un lado, el acetato presente en el medio de esporulación es usado en las etapas tempranas como fuente de energía y como fuente de carbono estructural para la formación de nuevas macromoléculas, a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos [Esposito *et al.*, 1969; Deutschbauer *et al.*, 2002; Neiman, 2005]. Por otro lado, la función mitocondrial es necesaria para la respuesta transcripcional asociada al proceso de esporulación [Marmioli y Lodi, 1984], siendo necesaria la respiración para la correcta expresión de *Ime1* independientemente de la glucosa disponible en el medio [Jambhekar y Amon, 2008].

La síntesis de proteínas mitocondrial también ha sido descrita como un proceso necesario para que se desarrolle la esporulación [Codon *et al.*, 1995], de manera que en presencia de eritromicina (antibiótico que inhibe la síntesis de proteína mitocondrial) las levaduras no desarrollan la esporulación, siempre que el antibiótico sea añadido en las primeras etapas del proceso [Marmioli *et al.*, 1983]. Incluso se ha propuesto que la esporulación se desarrolla mejor a temperaturas más bajas de las óptimas para el crecimiento vegetativo porque éstas coinciden con la temperatura óptima para la síntesis de proteínas mitocondrial [Codon *et al.*, 1995].

Relacionar la esporulación y la respiración con las proteínas ribosómicas P no parece en absoluto evidente; no obstante, recordemos que tanto la compleja cascada de señalización celular que experimentan las levaduras al momento de iniciar el proceso de esporulación, como la estricta comunicación que debe existir entre el genoma nuclear y el genoma mitocondrial para garantizar la correcta función de las mitocondrias, requieren la

participación de la síntesis de proteínas citoplasmática y por lo tanto DE los ribosomas y sus proteínas. En base a la hipótesis de la regulación traduccional mediada por el tallo ribosómico, la ausencia de proteínas P asociadas al tallo ribosómico en los mutantes D45 y D67 ocasionaría cambios en el patrón de expresión protéica que podría alterar los procesos de esporulación ó respiración, lo que explicaría el defecto en la esporulación descrito por Remacha y colaboradores [Remacha *et al.*, 1995a]. Alternativamente, y puesto que las proteínas P forman un reservorio citoplasmático que (al no poder unirse a los ribosomas) se encuentra afectado en estos mutantes, cabe pensar que estos defectos sean la consecuencia de la pérdida de alguna función extrarribosómica asociada a las mismas.

II. *Objetivos*

II.1 OBJETIVO GENERAL

Estudio de dos fenotipos característicos de la ausencia de proteínas P en el tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*:

- a) Incapacidad de esporular
- b) Generación de un alto porcentaje de mutantes *petite* espontáneos

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análisis de la esporulación en los mutantes diploides sin proteínas P asociadas al tallo.
 - 1.1. La esporulación en ausencia de las proteínas P1 (mutantes D67).
 - 1.2. La esporulación en ausencia de las proteínas P2 (mutantes D45).
2. Estudio del fallo mitocondrial en mutantes D45.

III. *Materiales y Métodos*

III.1 MATERIAL BIOLÓGICO

III.1.1 Cepas de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* utilizada en este trabajo es la DH5α [Hanahan, 1983].

III.1.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla III.1.

Tabla III.1 Cepas de *S. cerevisiae*.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
AN120	<i>MATα/MATα, ura3/ura3, trp1::HISG/trp1::HISG, his3/his3, ho::LYS2/ho::LYS2, leu2/RME1::LEU2, arg4-NSP1/ARG4</i>	[Neiman et al., 2000]
YP458	<i>MATα, ura3, trp1::HISG, leu2, ho::LYS2, RME1::HIS3, arg4-NSP1</i>	[San-Segundo y Roeder, 2000]
YP459	<i>MATα, ura3, trp1::HISG, leu2, ho::LYS2, RME1::HIS3, arg4-NSP1</i>	[San-Segundo y Roeder, 2000]
Wtp ⁰	<i>MATα, ura3, trp1::HISG, leu2, ho::LYS2, RME1::HIS3, arg4-NSP1</i> , tratado con Bromuro de etidio	En este trabajo
P.esp _{AN120}	<i>MATα/MATα, ura3/ura3, trp1::HISG/trp1::HISG, his3/his3, ho::LYS2/ho::LYS2, leu2/RME1::LEU2, arg4-NSP1/ARG4</i> , convertido en <i>petite</i> de manera espontánea	En este trabajo
W303	<i>MATα, ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1</i>	[Thomas y Rothstein, 1989]
P.esp _{W303}	<i>MATα, ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1</i> , convertido en <i>petite</i> de manera espontánea	[Thomas y Rothstein, 1989]
X17/17	<i>MATα, his1-123</i>	[Zuniga et al., 1999]
X17/14	<i>MATα, his 1-123</i>	[Zuniga et al., 1999]

MaVD7	<i>MATα, leu2, trp1, his3, ade2, cyh 2R, can1, gal4Δ, gal80Δ, GAL1::lacZ, HIS3, UAS, GAL1::HIS3, LYS2, SPAL 10, UASGAL1::URA3, RPP1A::KanMX4-LoxP</i>	[Francisco-Velilla y Remacha, 2010]
MaVD6	<i>MATα, leu2, trp1, his3, ade2, cyh 2R, can1, gal4Δ, gal80Δ, GAL1::lacZ, HIS3, UAS, GAL1::HIS3, LYS2, SPAL 10, UASGAL1::URA3, RPP1B::KanMX4-LoxP</i>	[Francisco-Velilla y Remacha, 2010]
MaVD5	<i>MATα, leu2, trp1, his3, ade2, cyh 2R, can1R, gal4Δ, gal80Δ, GAL1::lacZ, HIS3, UAS, GAL1::HIS3, LYS2, SPAL 10, UASGAL1::URA3, RPP2B::KanMX4-LoxP</i>	[Francisco-Velilla y Remacha, 2010]
MaVD4	<i>MATα, leu2, trp1, his3, ade2, cyh 2R, can1R, gal4Δ, gal80Δ, GAL1::lacZ, HIS3, UAS, GAL1::HIS3, LYS2, SPAL 10, UASGAL1::URA3, RPP2A::KanMX4-LoxP</i>	[Francisco-Velilla y Remacha, 2010]
d4d5	<i>MATα/MATα, ura3/ura3, trp1::HISG/trp1::HISG, his3/his3, ho::LYS2/ho::LYS2, leu2/RME1::LEU2, arg4-NSP1/ARG-4, RPP2B/RPP2B::LoxP, RPP2A/RPP2A::KanMX4-LoxP</i>	En este trabajo
D45_{.01}→_{.06}	<i>MATα ó MATα ura3, trp1::HISG, his3, ho::LYS2, RME1::LEU2, arg4-NSP1, RPP2B::LoxP, RPP2A::KanMX4-LoxP</i>	En este trabajo
DD45	<i>D45_{.01} MATα + D45_{.03} MATα</i>	En este trabajo
D5 a	<i>MATα, ura3, trp1::HISG, leu2, ho::LYS2, RME1::HIS3, arg4-NSP1, RPP2B::KanMX4-LoxP</i>	En este trabajo
D45_{.101}→_{.160}	<i>MATα o MATα, ura3, trp1::HISG, leu2, ho::LYS2, RME1::HIS3, arg4-NSP1, RPP2BLoxP, RPP2A::KanMX4-LoxP</i>	En este trabajo
D45 p⁻	<i>MATα leu2-3, 112, trp1-1, RPP2B::HIS3, RPP2A::URA3, can1-100</i>	[Remacha et al., 1992]
D45_{W303}	<i>MATα leu2-3, 112, trp1-1, RPP2B::HIS3, RPP2A::URA3, can1-100</i>	[Nusspaumer, 1999]
Wtp⁰+D45_{.03}	<i>Wt p⁰ MATα + D45_{.03} MATα</i>	En este trabajo

D45dGP5	<i>MATα, ura3, trp1::HISG, leu2, ho::LYS2, RME1::HIS3, arg4-NSP1, RPP2B::LoxP, RPP2A::KanMX4-LoxP</i> , transformado con pBG45/70	En este trabajo
DD45dGP5	D45dGP5 <i>MATα</i> + D45. ₀₃ <i>MATα</i>	En este trabajo
d6d7	<i>MATα/MATα, ura3/ura3, trp1::HISG/trp1::HISG, his3/his3, ho::LYS2/ho::LYS2, leu2/RME1::LEU2, arg4-NSP1/ARG4, RPP1A/RPP1A::KanMX4-LoxP, RPP1B/RPP1B::LoxP</i>	En este trabajo
D67	<i>MATα ó MATα, ura3, trp1::HISG, his3, ho::LYS2, leu2, arg4-NSP1, RPP1A::KanMX4-LoxP, RPP1B::LoxP</i>	En este trabajo
DD67	D67. ₁₅ <i>MATα</i> + D67. ₀₁₃ <i>MATα</i>	En este trabajo
D4567	<i>MATα, RPP1A::LEU2, RPP1B::TRP1, RPP2B::HIS3, RPP2A::URA3, can1-100</i>	[Remacha <i>et al.</i> , 1995a]
dGP0_{W303}	<i>MATα, leu2-3, 112, trp1-1, his3-11, 15, ade2-1, can1-100, RPP0::URA3-GAL1-RPP0</i>	[Santos y Ballesta, 1995]
ddGP0	<i>MATα/MATα, ura3/ura3, trp1::HISG/trp1::HISG, his3/his3, ho::LYS2/ho::LYS2, leu2/RME1::LEU2, arg4-NSP1/ARG4, RPP0/RPP0::GAL1-RPP0-Kan-LoxP</i>	En este trabajo
dGP0.₀₁→₀₁₀	<i>MATα ó MATα, ura3, trp1::HISG, his3 ho::LYS2, leu2 ó RME1::LEU2, ARG4, RPP0::GAL1-RPP0-Kan-LoxP</i>	En este trabajo
P0ΔAB_{W303}	<i>MATα, leu2-3, 112, trp1-1, his 3-11, 15, ade2-1, can1-100, RPP0::URA3-GAL1-RPP0</i> transformado con pFL37P0ΔAB	[Cárdenas, 2008]
P0ΔAB	dGP0. ₀₁ <i>MATα</i> transformado con pFL37P0ΔAB	En este trabajo
DP0ΔAB	P0ΔAB <i>MATα</i> + dGP0. ₀₄ <i>MATα</i>	En este trabajo
P0Wt	dGP0. ₀₁ <i>MATα</i> transformado con pFL37P0Wt	En este trabajo

DPOWt	POWt MATα + dGP0.04 MATα	En este trabajo
--------------	---	------------------------

III.2 PLÁSMIDOS

Las características relevantes de los plásmidos usados en este trabajo se detallan en la tabla II.2.

Tabla III.2 Plásmidos.

PLÁSMIDOS	TAMAÑO (Kb)	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
pSH47	6,9	ARS-CEN6, <i>URA3</i> , <i>PR-GAL1:CRE</i>	[Guldener <i>et al.</i> , 1996]
pTV100U-mtGFP	7,8	2 μ , <i>URA3</i> , PADH1:mitGFP	[Westermann y Neupert, 2000]
pFL38P2β	5,6	ARS-CEN6, <i>URA3</i> , 5'UTR-RPP2B-3'UTR	[Nusspaumer, 1999]
pFL38P2α	6,9	ARS-CEN6, <i>URA3</i> , 5'UTR-RPPA-3'UTR	En este trabajo
pFI37P0ΔAB	7,8	ARS-CEN6, <i>HIS3</i> , pMB1 ori, RPP0 Δ AB	[Cárdenas, 2008]
pFI37P0wt	8,0	ARS-CEN6, <i>HIS3</i> , pMB1 ori, RPP0WT	[Cárdenas, 2008]
pBG45/70	6,1	ARS-CEN6, <i>URA3</i> , <i>GAL1-70NT</i> 5'UTR-RPP2B-3' UTR	[Bermejo, 1992]
BSKGPO	8,4	Amp ^R , pBluescript KS + 5' UTR-PO:KANMX4: <i>GAL1:RPP0-3'UTR-PO</i>	[Guarinos, 1999]
YEplac111⁽¹⁾	5,7	2 μ , <i>LEU2</i>	[de la Cruz <i>et al.</i> , 1997]

(1) Vector en el que está clonado la librería genómica de W303

III.3 MEDIOS DE CULTIVO

III.3.1 Medio de cultivo para *E. coli*

E. coli se cultivó de manera rutinaria en medio LB (bactotripton 1%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 1% pH 7). En caso de requerirse el crecimiento en medio sólido se agregó

agar al 2%. Para la selección de células con resistencia a ampicilina se suplementó el medio con este antibiótico a una concentración final de 100 µg/ml.

III.3.2 Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

Para el crecimiento convencional de la levadura se utilizaron medios con glucosa como fuente de carbono, YEPD (peptona 2%; glucosa 2%; extracto de levadura 1%). Para inducir genes controlados por el promotor *GAL1* se utilizó medio YEPGal (peptona 2%; galactosa 2%; extracto de levadura 1%). Para seleccionar las células con metabolismo respiratorio se empleó el medio YEPGE que contiene fuentes de carbono no fermentables como el glicerol y etanol (peptona 2%; extracto de levadura 1%; glicerol 3% y etanol 2%).

Para seleccionar levaduras transformantes con plásmidos que contenían algún marcador metabólico, se empleó el medio SC (YNB sin aminoácidos 0,67%) con la fuente de carbono requerida en cada caso SCD = glucosa 2%, SCGal = galactosa 2% o SCGE = glicerol 3% y etanol 2%, suplementado con los requerimientos de aminoácidos necesarios [Trecó y Lundblad, 2001].

En los ensayos de traducción *in vivo* de proteínas mitocondriales, las levaduras se cultivaron en medios que contenían únicamente YNB 0,67%; glucosa (SD-medium) o galactosa (SGal) al 2% y todos los aminoácidos excepto metionina a una concentración final de 12 µg/ml.

La selección de cepas resistentes al glicósido G418 se realizó agregando este antibiótico a una concentración final de 250 µg/ml. Los medios sólidos se consiguieron agregando agar al 2%.

III.3.3 Diferenciación de células con metabolismo respiratorio

Para diferenciar en placas las colonias que presentan metabolismo respiratorio de las que no, se empleó el método descrito por Ogur y colaboradores (1957). Para ello se cubrió la placa que contenía las colonias a analizar, con una solución de cloruro de 2,3,5 triphenyltetrazolium 0,1% en tampón fosfato 0,067 M pH 7 y agarosa 0,5%. Las colonias que presentan metabolismo respiratorio se tiñen de color rojo, mientras que las colonias que poseen deficiencia respiratoria se quedan blancas [Ogur *et al.*, 1957].

III.3.4 Inducción de la esporulación en *S. cerevisiae*

Para inducir la esporulación de las células diploides se utilizó el medio SPM (acetato de potasio 3% suplementado con los requerimientos de aminoácidos a 10 mg/l), para lo cual las células en fase logarítmica de crecimiento fueron recogidas mediante centrifugación (a temperatura ambiente), lavadas dos veces con agua destilada e incubadas a 30°C en medio SPM hasta la aparición de las ascas producto de la esporulación [Treco y Winston, 2008].

III.4 ENZIMAS Y REACTIVOS

Las Polimerasas usadas en las reacciones de PCR fueron exTaq (Takara) y GoTaq®Flexi (Promega) y las enzimas de restricción empleadas en este trabajo fueron suministrados por MBI Fermentas y New England BioLabs. Se empleó además ligasa del Bacteriofago T4 de MBI Fermentas, Zimoliasa-100T de Seikagaku Biobusiness Corporation, RNAsa A de Roche, DNAsa libre de RNAsa de Sigma, proteinasa K de Sigma.

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos fueron suministrados por Merck, Sigma, Fluka, y los componentes de los medios de cultivo por Difco, Merck, Gibco, Sigma y MP Biomedicals.

Otros reactivos usados fueron: agarosa, SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) acrilamida, bisacrilamida, EDTA, PMSF, ADN de esperma de salmón, ampicilina, geneticina, BSA (Sigma), APS, TEMED (Serva) DTT, β-mercaptoetanol, sorbitol, manitol, sacarosa, Trizma base, Tris-maleato, ácido cumárico, luminol (Fluka), SDS, dNTs para PCR (Boehringer Mannheim y Takara), PEG 4000, aminoácidos, fenol, etanol, cloroformo, alcohol isoamílico, leupeptina, aprotinina, pepstatina, bestatina, quimostatina y antipaína (Calbiotech), reactivo Bradford (Bio-Rad), Hepes, Triton X100, Tween20, DAPI, cloruro de 2,3,5 Triphenyltetrazolium, NADH, ADP, digitonina (SIGMA), oligomicina, carboxiatractilósido, antimicina A, metionina [³⁵S] y Amplify (Amersham Bioscience).

III.5 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

III.5.1 Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*

La preparación de ADN plasmídico a partir de células bacterianas se llevó a cabo según el método de lisis alcalina [Sambrook y Russell, 2006] utilizando el kit de Promega DNA Purification system.

III.5.2 Obtención de ADN genómico de *S. cerevisiae*

La preparación de ADN total de *S. cerevisiae* se hizo según el método descrito por Moore y colaboradores [Moore *et al.*, 2002].

III.5.3 Extracción de ADN plasmídico incorporado a *S. cerevisiae*

Para la extracción de plásmidos de la levadura *S. cerevisiae* se siguió el método descrito por Moore y colaboradores (2002) con algunas modificaciones [Moore *et al.*, 2002]. Se recogieron aproximadamente $6,5 \times 10^8$ células de un cultivo en fase estacionaria (calculado en base a la relación de que $1 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 6,5 \times 10^7$ células/ml), por centrifugación durante 2 minutos a máxima velocidad en una centrífuga de mesa a temperatura ambiente (TA). Al sedimento se agregó 200 µl de tampón de ruptura (Triton X100 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM), un volumen equivalente a 200 µl de perlas de vidrio y 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se aplicó vortex durante 2 minutos. Seguidamente se centrifugó 5 min. a TA a máxima velocidad, recogiendo la fase acuosa a partir de la cual se precipitó el ADN. Con el ADN obtenido se transformó *E. coli* competente y la colonias resultantes deberán obtener el plásmido rescatado de la levadura

III.5.4 Obtención de fragmentos de ADN mediante PCR

En cada reacción se añadió: oligonucleótidos a una concentración final de 0,2 mM; MgCl_2 2 mM; una solución de sales 1X especificada para el polimerasa utilizada; dNTPs 2 mM, 0,5 - 1 unidades de enzima y una cantidad de ADN molde que podía variar según se tratara de ADN plasmídico (10 ng) o genómico (100 ng).

Los programas de amplificación incluían una desnaturalización previa de 45 segundos a 94°C; 35 ciclos que incluían: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, una hibridación durante 30 segundos a una temperatura que dependía de la T_m de los oligonucleótidos utilizados, y un ciclo de polimerización a 72°C, cuya duración dependía del tamaño del fragmento de ADN que se deseaba amplificar, tomando en consideración que la velocidad de polimerización es de 1 kb por minuto; además, una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

III.5.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa, se cortó la banda correspondiente y para la purificación se utilizó el kit QIAquick gel extraction kit de Qiagen.

III.5.6 Extracción de ARN total de levaduras

Para extraer ARN total de levadura se siguió el protocolo de extracción con fenol ácido y SDS a 65°C [Collart y Oliviero, 2001] y posteriormente se purificó con el kit Qiagen RNeasy Mini Kit. La cantidad de ARN purificado fue cuantificado mediante medición espectrofotométrica a 260 nm, empleando para ello un *NanoDrop*.

III.5.7 Síntesis de cDNA

Para detectar la expresión cualitativa de ARNm específicos, se realizó transcripción reversa a partir de ARN de levadura empleando para ello el Kit de Reverse Transcription System de Promega. El cDNA obtenido fue usado como molde en reacciones de PCR empleando la combinación de oligonucleótidos específicos para el ó los genes a los que se deseaba analizar su expresión.

III.6 OLIGONUCLEÓTIDOS

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron suministrados por Isogen Life Sciences y se detallan en la tabla III.3.

Tabla III.3 Oligonucleótidos.

NOMBRE	SECUENCIA
YP1 α -1	5' GACCCTCATGATTACCGCTCG 3'
YP1 α -4	5' TTCCTTAACCTTATAGTCTGG 3'
P1 α R	5' GCTGAAGCTGAAGCTGAA 3'
5'ORF2 β	5' CAGTATGGATCGTGTA 3'
YP2 β -4	5' TACTTCGCCACTTACAATGGG 3'
2B3'	5' GCTCTCAAATAGGCGAAA 3'
YP1 β -3	5' TTTTCATTTCTGCGTGTCGCG 3'
YP1 β -4	5' GATGGTTAAATTCTCGTAGCCCTT 3'
5'555UTR-P1B	5' GCACATGTGAAGGAACAAC 3'

YP2α-5	5' CTGTAACATCATGGCAGCCG 3'
YP2α-6	5' TCGGTTTGAATTTTGAAGATG 3'
OL44-33	5' CCTCCACTCTAGCCTTCTCG 3'
P0N1	5' GGCCTCAACGACCTTGACATCAGA 3'
5'P0	5' ATTTACTGACTGTGCGGATTA 3'
DirYep351	5' GGCTTTACACTTTATGCTTCCGG 3'
RevYep351	5' GGGGATGTGCTGCAAGGCGAT 3'
5' Cox2	5' ATTTTCAGGATTCAGCAACACC 3'
3' Cox2	5' AATTGGCATATTTGCATGACC 3'
5' Actina	5' ACGAATTGAGAGTTGCCCCAGAAGA 3'
3' Actina	5' TTGAAGAAGATTGAGCAGCGGTTTG 3'

III.7 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR

III.7.1 Transformación de *E. coli*

Las células se hicieron competentes según el método de cloruro de rubidio [Hanahan, 1985] y se transformaron mediante choque térmico [Hanahan, 1983].

III.7.2 Transformación de *S. cerevisiae*

Las cepas de levadura se hicieron competentes según el método del acetato de litio [Gietz *et al.*, 1995] y se transformaron mediante choque térmico [Ito *et al.*, 1983; Becker y Lundblad, 1993].

III.8 DISRUPCIÓN GÉNICA

La disrupción de los genes correspondientes a las proteínas ácidas se realizó empleando el gen de resistencia a geneticina, siguiendo el protocolo de Guldener *et al.*, 1996. Este marcador selectivo, *KanMX4*, codifica una proteína (aminoglicósido fosfotransferasa)

que confiere resistencia a kanamicina en *E. coli* y a geneticina (G418) en *S. cerevisiae* [Jimenez y Davies, 1980] y está flanqueado por secuencias repetidas *LoxP*.

III.9 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

III.9.1 Electroforesis de ADN

Los métodos utilizados para separar fragmentos de ADN en geles de agarosa/TAE fueron los descritos por Sambrook y Russell [Sambrook y Russell, 2006].

III.9.2 Electroforesis de proteínas

Las muestras de proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida (PAGE/SDS) al 10, 12,5 ó 15% siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell [Sambrook y Russell, 2006] con un equipo Miniprotean III de BioRad.

III.9.3 Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana

Tras separar las proteínas en geles de SDS-PAGE, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF (Inmobilon Millipore) que fue humedecida previamente en metanol para su activación. Para la transferencia se utilizó el sistema de transferencia húmeda de BioRad en tampón de transferencia (Trizma base 25 mM; glicina 192 mM y metanol 20%), aplicando un voltaje de 100V durante 1 hora. Una vez finalizada la transferencia, se realizó la detección inmunológica de las proteínas según el método descrito por Towbin y colaboradores [Towbin *et al.*, 1982]. Los anticuerpos utilizados en este trabajo se detallan en la tabla III.4.

Tabla III.4 Anticuerpos empleados en la detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana.

ANTICUERPO	ANTÍGENO	TIPO	DILUCIÓN	REFERENCIA
916	P1 α	Policlonal en conejo	1:2500	[Zurdo <i>et al.</i> , 2000]
1CE1	P1 β	Monoclonal	-	[Vilella <i>et al.</i> , 1991]
1BE3	P2 α	Monoclonal	-	[Vilella <i>et al.</i> , 1991]
1AA9	P2 β	Monoclonal	-	[Vilella <i>et al.</i> , 1991]

3BH5	Proteínas P	Monoclonal	1:10	[Vilella <i>et al.</i> , 1991]
Actina	Actina	Monoclonal	1:3000	InmunO MPBiomedicals
Carboxipeptidasa Y (CpY)	Prc1 (vacuolas)	Monoclonal	1:500	Molecular Probes
1AD7	L12	Monoclonal	1:20	[Vilella <i>et al.</i> , 1991]
Vps10p	Pep (Golgi)	Monoclonal	1:500	Molecular Probes
Sal1	Extremo N- terminal de Sal1	Policlonal en conejo	1:5000	[Cavero <i>et al.</i> , 2005]
Cox2	Proteína mito- condrial Cox2	Policlonal en conejo	1:500	[Herrmann <i>et al.</i> , 1995]
MrpL40	Proteína L40 mito- Ribosómica	Policlonal en conejo	1:500	[Gruschke <i>et al.</i> , 2010]
RαM/Po	Ig de Ratón	Policlonal	1:2500	Nordic Immunology
DαR/Po	Ig de Conejo	Policlonal	1:2500	Amershan Biosciences

Para realizar densitometría de las bandas detectadas mediante el Western blot; se empleó el equipo GS-800 Calibrated Densitometer y el programa Quality One-4.6.3 (1D Analysis Software) ambos de Bio-Rad.

III.10 OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE *S. cerevisiae*

III.10.1 Obtención de extracto total mediante lisis alcalina

Para la obtención de extracto total de levadura por lisis alcalina se inocularon las células en un medio adecuado y se dejaron crecer hasta fase estacionaria, centrifugando el volumen necesario que contenía $1,4 \times 10^8$. Las células lavadas se resuspendieron en agua destilada a una concentración de $1,4 \times 10^9$ células/ml. Después se agregó un volumen de NaOH 0,2 N y se incubó durante 4 minutos a temperatura ambiente. Las células se recuperaron por centrifugación (1 minuto a máxima velocidad en una microcentrífuga) y se eliminó el

sobrenadante. El sedimento de células se lavó con abundante agua destilada (hasta llenar completamente el tubo) y se resuspendió en 40 µl de tampón de carga de SDS (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; glicerol 10%; SDS 0,5%; DTT 0,5 M). Para garantizar la ruptura de las células, la suspensión fue hervida durante 5 min. (95°C) y agitada durante 1 min. al vortex. Antes de cargar la muestra en el gel de PAGE/SDS se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad en una microcentrífuga de mesa a temperatura ambiente.

III.10.2 Obtención del extracto total citoplasmático (S30)

Para la obtención de la fracción S30, se partió de cultivos de levadura en fase logarítmica de crecimiento. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm en un rotor Sorvall SS-34 a una temperatura de 4°C y se resuspendieron en el tampón 1 de levadura (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; β-mercaptoetanol 5 mM; KCl 20 mM; MgCl₂ 12,5 mM). Al sedimento de células lavadas se añadieron perlas de vidrio y tampón 1 de levadura con una mezcla de inhibidores de proteasas (bestatina 10 µM, quimostatina 50 µM, PMSF 1 mM, pepstatina 50 µM, aprotinina 100 U/ml., leupeptina 50 µM y antipaína 25 µM) y se rompieron mediante el sistema *Fastprep* 120 (BIO101), con 1 ciclo de 40 segundos y velocidad 6, a 4°C. El extracto fue centrifugado dos veces durante 15 minutos a 4°C en una microcentrífuga a máxima velocidad para el clarificado de la fracción.

En el caso de utilizarse directamente esta fracción, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford [Bradford, 1976].

III.10.3 Obtención de la fracción citoplasmática libre de ribosomas (S100) y la fracción de ribosomas

Para la obtención de estas fracciones se partió de la fracción S30 que se centrifugó a 90000 rpm durante 1 hora en un rotor TLA100.3 a una temperatura de 4°C. Producto de esta centrifugación se obtiene un sedimento que corresponde a los ribosomas sucios, y el sobrenadante que corresponde al S100. En caso de requerirse el estudio de los ribosomas sucios (con proteínas citoplasmáticas asociadas) el sedimento de la centrifugación se resuspendió en tampón 1 de levadura. Cuando se requirió la preparación de ribosomas limpios (libre de proteínas asociadas), el sedimento de ribosomas sucios se resuspendió en tampón 2 de levaduras (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NH₄Ac 500 mM; MgCl₂ 100 mM y β-mercaptoetanol 5 mM) y se cargó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (0,4 ml de

sacarosa al 20% en tampón 2 sobre 0,6 ml de sacarosa al 40% en tampón 2). El gradiente se centrifugó a 90000 rpm durante 2 horas en el rotor TLA100.3 a una temperatura de 4°C. El sedimento resultante corresponde a los ribosomas lavados, que se resuspendieron en tampón 1 de levadura.

Para la cuantificación de la concentración de proteína en el extracto S100, se utilizó el método Bradford [Bradford, 1976]. Para determinar la concentración de los ribosomas, se midió su absorbancia en el espectrofotómetro *Nanodrop* a una longitud de onda de 260 nm, teniendo en cuenta que una disolución de partículas ribosómicas 80S a 1 mg/ml absorbe 14 unidades de absorbancia a 260 nm.

III.11 PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS Y SUBFRACCIONES MITOCONDRIALES

III.11.1 Obtención de mitocondrias con alto grado de pureza

El procedimiento empleado fue el descrito por Gregg y colaboradores [Gregg *et al.*, 2009]. Se parte de un litro de cultivo de levaduras en fase exponencial de crecimiento, las cuales fueron sedimentadas mediante centrifugación a 3000 xg durante 5 min. y lavadas 2 veces con agua destilada antes de estimar el peso húmedo.

El sedimento de células obtenido fue resuspendido en tampón DTT (Tris-H₂SO₄ 100 mM pH 9,4; DTT 10 mM) a razón de 2 ml/g de células e incubado a 30°C durante 20 min. a 70 rpm. Las células fueron centrifugadas a 3000 xg durante 5 min. a temperatura ambiente y lavadas con tampón Zimoliasa (fosfato potásico 20 mM pH 7,4; sorbitol 1,2 M) por gramo de células. Posteriormente se resuspendió en el mismo tampón (a razón de 7 ml/g células) y se agregó Zimoliasa-100T (1 mg/g células), incubando a 30°C durante 40 min. a 70 rpm. Los esferoplastos formados fueron centrifugados a 2000 xg durante 8 min. a 4°C y resuspendidos en tampón de homogenización (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; sorbitol 0,6 M; EDTA 1mM; BSA 0,2%) y centrifugados nuevamente a 2000 xg durante 8 min. a 4°C. La ruptura de las células se realizó con un homogenizador de vidrio (previamente enfriado), para lo cual las células se resuspendieron nuevamente en tampón de homogenización (6,5 ml/g células) y se aplicaron 30 golpes.

El lisado celular se centrifugó 5 min. a 1500 xg a 4°C y seguidamente el sobrenadante se centrifugó 5 min. a 3000 xg a 4°C. El sobrenadante resultante se centrifugó a 15 min. a

12000 xg a 4°C. El sedimento obtenido fue resuspendido en tampón de homogenización (6,5 ml/g de células) y seguidamente centrifugado 5 min. a 3000 xg a 4°C; nuevamente el sobrenadante se centrifugó 15 min. a 12000 xg a 4°C. El sedimento resultante constituyó la fracción de mitocondrias crudas.

Con la finalidad de eliminar los orgánulos contaminantes, la fracción de mitocondrias crudas fue purificada a través de un gradiente discontinuo de sacarosa (60%, 32%, 23% y 15%) en tampón EM (MOPS/KOH 10 mM pH 7,2; EDTA 1 mM). Sobre este gradiente se colocaron las mitocondrias crudas previamente resuspendidas en tampón SEM (MOPS/KOH 10 mM pH 7,2; sacarosa 250 mM; EDTA 1 mM). El gradiente fue centrifugado a 134000 xg durante 1 hora a 4°C.

Las mitocondrias purificadas se recuperaron a partir de la interfase entre los colchones de 60% y 32%, se diluyeron 2 veces con tampón SEM y nuevamente se centrifugó a 134000 xg durante 30 min. a 4°C. La fracción mitocondrial finalmente fue resuspendida en el tampón adecuado, cuantificando la cantidad de proteínas mediante la técnica de Bradford.

III.11.2 Fraccionamiento mitocondrial

El fraccionamiento mitocondrial se realizó siguiendo el protocolo publicado por Daum y colaboradores [Daum *et al.*, 1982], con algunas modificaciones. Para ello, se partió de mitocondrias purificadas (apartado III.11.1) resuspendidas en tampón manitol (manitol 0,6 M; Tris-HCl 10 mM pH 7,4) a una concentración de 20 mg/ml. Esta suspensión de mitocondrias fue diluida con 5 volúmenes de Tris-HCl 10 mM pH 7,8 e incubada a 4°C con agitación suave. Seguidamente se centrifugó la suspensión en un rotor TLA100.3 a 28000 rpm durante 28 min.; el sobrenadante producto de esta centrifugación contiene los componentes presentes en el espacio inter-membrana, y el sedimento los mitoplastos.

Para la extracción de la matriz mitocondrial, los mitoplastos fueron resuspendidos en Tris-HCl 10 mM pH 7,8 a una concentración de 2 mg/ml e incubados en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo se agregó 1/3 de volumen de una solución que contenía sacarosa 1,8 M; ATP 8 mM; MgCl₂ 8 mM pH 7,8, se mezcló por inversión varias veces y se incubó 5 min. en hielo. Para garantizar la ruptura completa de los mitoplastos, se aplicaron 3 ciclos de sonicación de 5 segundos cada uno. Las membranas mitocondriales fueron sedimentadas por centrifugación a 60000 rpm durante 1 hora (rotor TLA100.3) y el sobrenadante constituye la matriz.

Tanto la matriz como el contenido del espacio inter-membrana fueron clarificados por centrifugación durante 16 horas a 30000 rpm (rotor TLA100.3) a fin de garantizar la eliminación de cualquier fragmento de membrana restante.

Debido a que el sedimento de membranas mitocondriales constituye una mezcla de la membrana interna y membrana externa, se resuspendió el sedimento vigorosamente en Tris-HCl 10 mM pH 7,8 y se centrifugó a través de un gradiente lineal de sacarosa (30-50% sacarosa en Tris-HCl 10 mM pH 7,8) durante 15 horas (20000 rpm en rotor SW-27). Finalizada la centrifugación, la membrana externa se encuentra formando una banda en el tope del gradiente y la membrana interna se encuentra formando un botón en el fondo del tubo. Ambas fracciones de membrana fueron recolectadas y diluidas con 3 volúmenes de Tris-HCl 10 mM pH 7,8, y nuevamente centrifugadas a 95000 rpm durante 95 min. en el rotor TLA100.3.

III.11.3 Extracción de ADN mitocondrial

Para la extracción del ADN mitocondrial nos basamos en el protocolo de Defontaine y colaboradores [Defontaine *et al.*, 1991], con algunas modificaciones. Las mitocondrias purificadas (apartado III.11.1), fueron resuspendidas en una solución que contenía NaCl 100 mM; EDTA 10 mM; Sarcosyl 1%; Tris-HCl 50 mM pH 7,8 y RNasa libre de DNAsa a una concentración de 100 µg/ml, incubando 30 min. a temperatura ambiente.

El ADN mitocondrial fue purificado mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y la fase acuosa resultante fue precipitada con etanol. El ADN mitocondrial se resuspendió lentamente a 4°C en un pequeño volumen de agua (doblemente destilada). La cuantificación del ADN mitocondrial purificado se hizo midiendo espectrofotométricamente a 260 y 280 nm.

III.11.4 Purificación de ribosomas mitocondriales

El aislamiento de los ribosomas de mitocondria se realizó siguiendo el protocolo de Szyrach y colaboradores [Szyrach *et al.*, 2003]. Para ello, la fracción de mitocondrias purificadas (apartado III.11.1), fue lisada durante 20 minutos (a 4°C) con una solución de digitonina 2%; Tris-HCl 20 mM pH 7,4 en presencia de EDTA 5 mM. El extracto fue posteriormente clarificado por centrifugación durante 10 min. a 18000 xg a 4°C. Para aislar los ribosomas, el sobrenadante obtenido de la centrifugación anterior fue cargado sobre un

gradiente de alta densidad (sacarosa 1,6 M en Tris-HCl 20 mM pH 7,4) y centrifugado durante 1 hora a 436000 xg. El sedimento resultante de la centrifugación constituye los mito-ribosomas, los cuales fueron resuspendidos en tampón 1 de levadura y cuantificados mediante medición a 260-280 nm.

III.11.5 Identificación de proteínas asociadas a las mitocondrias

Con el fin de separar selectivamente las proteínas que pudieran estar unidas a las mitocondrias se realizaron tratamientos con carbonato de sodio (Na_2CO_3) y/o proteinasa K [Zuñiga, 2000]. El tratamiento con carbonato de sodio consistió en incubar 200 μg de mitocondrias previamente aisladas (apartado III.11.1) con Na_2CO_3 0,1 M (pH 11,5), durante 1 hora a 4°C. Después de la incubación, la reacción fue detenida agregando 1,5 ml de agua destilada fría. Las mitocondrias se centrifugaron a 90000 rpm (en rotor TLA100.3) durante 30 min. a 4°C. Tanto el sobrenadante como el sedimento fueron recuperados y analizados por separado. Las proteínas asociadas a las mitocondrias fueron precipitadas con 3 volúmenes de TCA-acetona (ácido tricloro acético al 13,3% en acetona) y recuperadas por centrifugación a 18000 xg, a 4°C durante 15 min., y posteriormente lavadas con acetona a -20°C y nuevamente centrifugadas a 18000 xg, a 4°C durante 15 min. El sedimento resultante se disolvió directamente en tampón de carga de SDS; igualmente, el sedimento de las mitocondrias fue directamente resuspendido en tampón de carga de SDS.

Para el tratamiento con proteinasa K, se incubaron 200 μg de mitocondrias aisladas con cantidades variables de proteinasa K (0,5-180 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 1 hora a 4°C. Para detener la reacción se agregó PMSF a una concentración final de 4 mM. A cada una de las muestras se agregó la cantidad necesaria de tampón de carga de SDS.

III.12 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

III.12.1 Aislamiento de mitocondrias activas

Para realizar esta medición fue necesario el aislamiento de mitocondrias activas en respiración, siguiendo el protocolo de Arechaga y colaboradores [Arechaga *et al.*, 1993]. Se partió de 2 litros de cultivo en fase logarítmica de crecimiento. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 8000 xg durante 5 min. a 4°C. y se lavaron 2 veces con agua destilada. El sedimento de levaduras se resuspendió en tampón β -SH (Trizma base 100 mM;

β -mercaptoetanol 0,5 M ajustado a pH 9,3 con NaOH) y se incubó a 30°C durante 10 min. a 70 rpm. Al finalizar la incubación las células se centrifugaron 5 min. a 8000 xg y se lavaron 2 veces con tampón Tris-KCl (Tris-HCl 10 mM; KCl 500 mM pH 7) aplicando la misma velocidad y tiempo de centrifugación. Posteriormente, las levaduras fueron incubadas con Zimoliasa-100T (1 mg de Zimoliasa-100T por gramo de células) en tampón de digestión (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; sorbitol 1 M; $MgCl_2$ 10 mM; DTT 30 mM) durante 1 hora a 30°C a 70 rpm. Los esferoplastos resultantes se recuperaron por centrifugación a 13000 xg durante 7 min. a 4°C y se lavaron 2 veces con tampón de protoplastos (sorbitol 0,75 M; manitol 0,4 M; Tris-maleato 10 mM pH 6,8; BSA 0,1%) centrifugando siempre en las mismas condiciones.

La homogenización de las células se realizó con un homogenizador de vidrio, para lo cual los esferoplastos se resuspendieron en tampón de homogenización (manitol 0,6 M; Tris-maleato 10 mM pH 6,8; K_2HPO_4 0,5 mM; BSA 0,2%; EDTA 1 mM) en presencia de PMSF 1 mM y pepstatina A 1 μ g/ml y se aplicaron 20 golpes. El lisado resultante se centrifugó a 2000 xg durante 5 min. a 4°C, recuperándose tanto el sobrenadante (S1) como el sedimento (P1). El S1 se centrifugó nuevamente a 12000 xg durante 10 min. y se recuperó el sedimento (P2). Tanto el P1 como el P2 se resuspendieron nuevamente en tampón de homogenización y se centrifugaron a 2000 xg durante 5 min. Los sobrenadantes resultantes (S2 y S3) se centrifugaron a 12000 xg durante 10 min., obteniéndose los sedimentos P3 y P4 que contienen la fracción de mitocondrias crudas. Ambos sedimentos (P3 y P4) fueron resuspendidos una vez más en tampón de homogenización y se unieron ambas fracciones mitocondriales para centrifugarlas nuevamente a 2000 xg durante 5 min. Las mitocondrias presentes en el sobrenadante se recuperaron por centrifugación a 12000 xg durante 10 min. Finalmente se realizó un último lavado de las mitocondrias en tampón de homogenización, centrifugando a 2000 xg durante 5 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 12000 xg durante 10 min. para obtener un sedimento de mitocondrias activas.

Estas mitocondrias fueron resuspendidas en tampón de homogenización (suplementado con $MgCl_2$ 2 mM y KH_2PO_4 2 mM) y cuantificada su concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford [Bradford, 1976].

III.12.2 Ensayo de actividad respiratoria mitocondrial

Para evaluar la capacidad para respirar de las mitocondrias de levaduras se siguió el protocolo de Tomas y colaboradores (2004) basado en la monitorización de la disminución de

la fluorescencia durante la oxidación mitocondrial del NADH. Las mitocondrias activas empleadas en estos ensayos fueron extraídas según el protocolo especificado en el apartado III.12.1 [Tomas *et al.*, 2004].

Los experimentos fueron desarrollados en microplacas de 96 pocillos donde se incubaron las mitocondrias (50 µg) en 100 µl de tampón de homogenización suplementado con MgCl₂ 2 mM, KH₂PO₄ 2 mM y 1 mM NADH. El seguimiento de la fluorescencia del NADH se en un espectrofotómetro *Fluo StartOptima* a 30°C. La excitación del NADH se realizó a 340 nm y se emisión a 460 nm. La actividad respiratoria mitocondrial es proporcional a la disminución de la fluorescencia del NADH ocasionada por la oxidación de este compuesto por las mitocondrias activas.

Para comprobar que la disminución en la fluorescencia del NADH era a consecuencia de la oxidación de este compuesto por parte de las mitocondrias, se diseñó un ensayo de inhibición de la actividad; en éste, a las mitocondrias incubadas en las condiciones detalladas anteriormente, se les añadió ADP 2 mM, a fin de estimular el consumo de NADH por la mitocondria. Además, se agregaron compuestos inhibitorios como oligomicina 6 µM, carboxiatractilósido 10 µM y antimicina A 0,25 µM y se registró la fluorescencia del NADH a 460 nm en presencia de cada uno de estos compuestos.

III.13 DESINTEGRACIÓN DE COMPLEJOS MITOCONDRIALES

A fin de establecer la composición de los complejos a los cuales está unida la proteína ribosómica P0, se realizaron tratamientos con DNAsa (0,12 U/µl), RNAsa (50 µg/ml), urea (7,5 M) y digitonina (2%). En cada caso se incubó a 37 °C durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 18000 xg. El sobrenadante obtenido contiene los componentes del complejo solubilizado durante cada tratamiento.

III.14 SÍNTESIS *in vivo* DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

La detección de síntesis de proteínas mitocondrial se realizó siguiendo el protocolo de Herrmann y colaboradores [Herrmann *et al.*, 1994]. Para ello se realizó marcaje *in vivo* de los productos de traducción mitocondrial con metionina ³⁵S (³⁵S-Met) y empleando cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas citoplasmática.

Las células fueron cultivadas en medio SD o medio SGal (apartado III.3) hasta una DO_{600} de 1, recogiendo $1,3 \times 10^8$ células mediante centrifugación a 4000 xg en una centrífuga de mesa a temperatura ambiente. Después de lavadas dos veces con agua y una vez en S-medio (YNB 0,67%) sin aminoácidos las células fueron finalmente resuspendidas a una concentración de $6,5 \times 10^7$ cel./ml en medio S más aminoácidos (12 μ g/ml) excepto metionina. Las células se incubaron durante 10 min. a 30°C, se agregó cicloheximida a una concentración final de 150 μ g/ml y se incubó durante 2,5 minutos a 30°C. Seguidamente se agregó 20 μ Ci de 35 S-Met y se incubó 15 min. a 30°C. Para detener la incorporación de 35 S-Met se agregó metionina fría a una concentración final de 16 mM; las células se recuperaron por centrifugación en las mismas condiciones antes especificadas, y se lavaron dos veces con medio S al que se le adicionó: aminoácidos 12 μ g/ml; metionina fría 16 mM y cicloheximida 150 μ g/ml. Las células fueron lisadas con la solución Rödel mix (NaOH 300 mM y β -mercaptoetanol 175 mM), incubadas 15 min. en hielo y las proteínas fueron precipitadas con TCA (concentración final al 12%) y recuperadas mediante centrifugación durante 30 min. a 28500 xg a 4°C, seguidamente fueron lavadas con acetona a -20°C, secadas al aire y finalmente resuspendidas en 80 μ l de tampón de carga SDS. Para garantizar la solubilización de las proteínas precipitadas, la resuspensión se realizó a 45°C en agitación constante.

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS/PAGE al 16%, tal como se indica en el apartado III.9.2. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue incubado durante 30 min. en solución de fijación (metanol 50%; ácido acético 10%) y seguidamente incubado 30 minutos en Amplify. Las proteínas mitocondriales sintetizadas y que incorporaron la metionina marcada (35 S-Met) fueron visualizadas mediante fluorometría.

III.15 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las muestras se prepararon a partir de cultivos en fase exponencial (0,4 - 0,8 unidades de DO_{600} /ml), se lavaron con PBS (NaH_2PO_4 4mM; Na_2HPO_4 2 mM; NaCl 145 mM) y se resuspendieron en una solución de DAPI (1 ng/ μ l en PBS) y se incubaron 5 minutos. Después, se centrifugaron 30 segundos en una microcentrífuga a máxima velocidad, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 μ l de PBS.

La suspensión de células se mezcló con 1 volumen de medio de montaje (*p*-fenilendiamina, preparado según el método descrito en Allan, 2000), se colocó en un

portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos; para evitar la entrada de aire y deshidratación de la muestra se colocó esmalte de uñas transparente alrededor del cubreobjeto.

Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio invertido *Axiovert200* (Zeiss) acoplado a una cámara CCD monocroma color del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC) del CBMSO. Se tomaron imágenes en campo claro y usando los láseres adecuados para observar DAPI y GFP, según el caso.

IV. *Resultados*

IV.1 CONSTRUCCIÓN DE CEPAS D45 Y D67 EN EL FONDO GENÉTICO SK1

La colección de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en proteínas P disponible en el laboratorio está realizada sobre el fondo genético W303 [Remacha *et al.*, 1995a]. Uno de los inconvenientes de esta cepa es la baja eficiencia de esporulación (10-20%), lo que hace que no sea la más adecuada para estudiar este proceso. Puesto que el objetivo de este trabajo es conocer el mecanismo por el cual la ausencia de las proteínas ácidas en la levadura *S. cerevisiae* la hace incapaz de esporular, nos planteamos construir las cepas diploides dobles mutantes (D45 y D67) en el fondo genético SK1 de *S. cerevisiae*, que posee una eficiencia de esporulación del $92\% \pm 5\%$ [Ben-Ari *et al.*, 2006]. Estas construcciones consisten en la delección de los dos genes que codifican las proteínas P1 (*RPP1A* y *RPP1B*) en la cepa denominada D67, o las proteínas P2 (*RPP2A* y *RPP2B*) en la llamada D45. Estas interrupciones se realizaron utilizando el módulo de reemplazamiento génico *KanMX4*, que confiere resistencia al antibiótico geneticina (G418). Para ello se amplificaron mediante PCR los módulos de reemplazamiento disponibles en el laboratorio [García-Marcos, 2005], empleando como molde el ADN genómico de cepas mutantes simples para cada una de las proteínas ácidas, MaVD4, MaVD5, MaVD6 y MaVD7 [Francisco-Velilla y Remacha, 2010] y usando una pareja de oligonucleótidos específicos para cada gen (Figura IV.1).

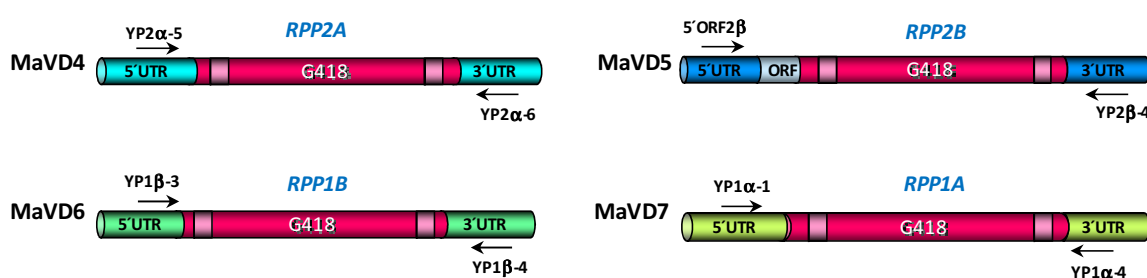


Figura IV.1 Módulos de reemplazamiento génico. Para obtener los mutantes que no expresen las distintas proteínas P, se amplificaron estos módulos a partir de las cepas MaVD4, MaVD5, MaVD6 y MaVD7, empleando en cada caso los oligonucleótidos especificados.

La obtención de las cepas D45 y D67 a partir de la cepa diploide AN120 se realizó de forma paralela, siguiendo la misma estrategia (Figura IV.2). Puesto que el módulo de reemplazamiento contiene regiones flanqueantes homólogas al gen que se desea eliminar, la inserción del *cassette* ocurre mediante recombinación homóloga dando lugar a cepas resistentes a geneticina que serán heterocigotas para los genes interrumpidos. En el

caso del doble mutante D45 la cepa diploide AN120 fue transformada con el primer módulo de reemplazamiento para la delección del gen *RPP2B* y así obtener una cepa d5.

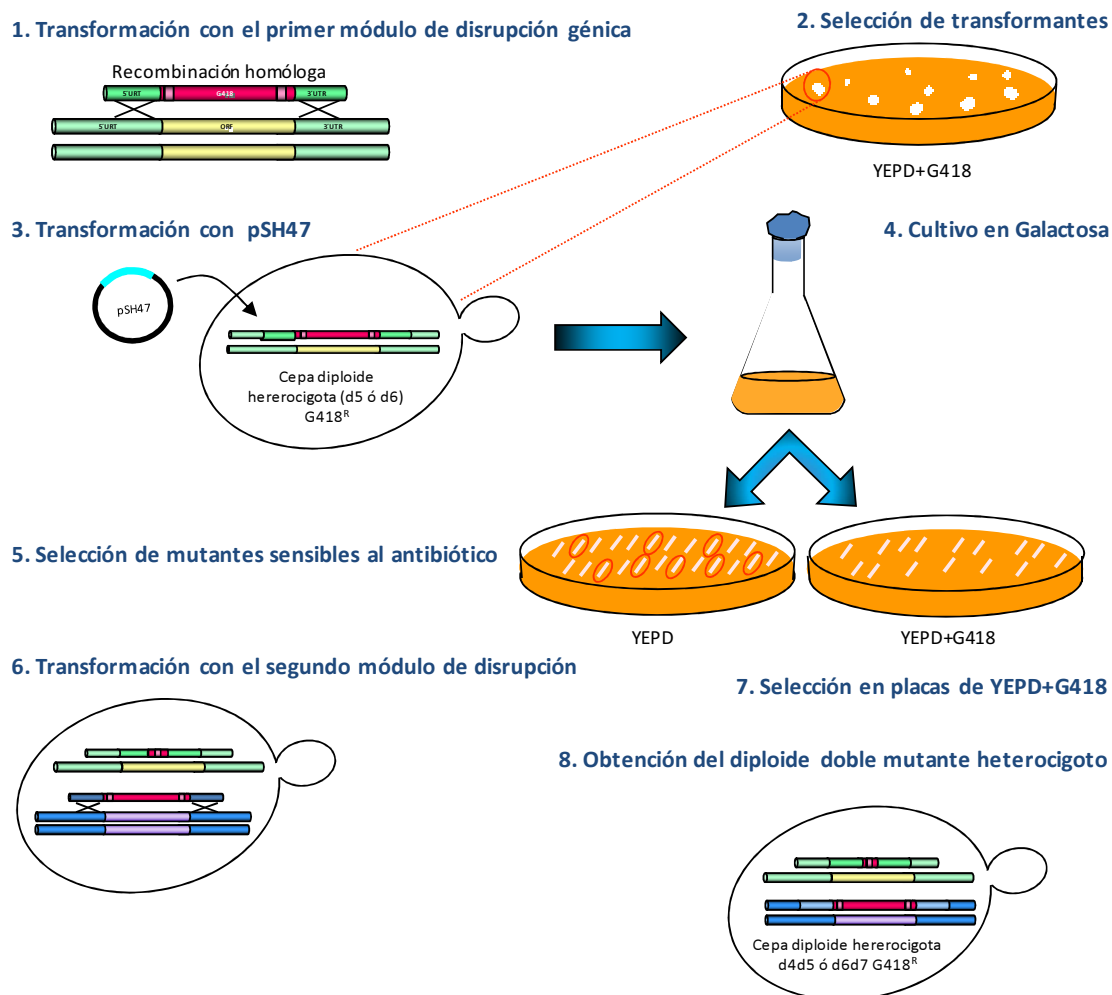


Figura IV.2 Esquema de las etapas seguidas para la construcción de los dobles mutantes heterocigotos d4d5 y d6d7 (ver detalles en el texto).

Tras comprobar mediante PCR la integración del módulo en la región correcta (Figura IV.3), se transformó el mutante seleccionado con el plásmido pSH47, el cual expresa la recombinasa *cre* bajo el promotor *GAL1*. El crecimiento en galactosa induce la expresión de esta enzima, ocasionando la eliminación del gen *kanMX4* por recombinação entre las secuencias *loxP* flanqueantes, de manera que la cepa vuelve a ser sensible a geneticina. Se seleccionaron clones sensibles al antibiótico y se comprobó mediante PCR la correcta eliminación del marcador (Figura IV.3). En este punto, el mutante heterocigoto d5 se transformó con el módulo de reemplazamiento para *RPP2A* (Figura IV.1). Los transformantes resistentes a

geneticina se chequearon por PCR confirmando la ausencia de una copia de los genes *RPP2A* y *RPP2B* en la cepa llamada d4d5 (Figura IV.3).

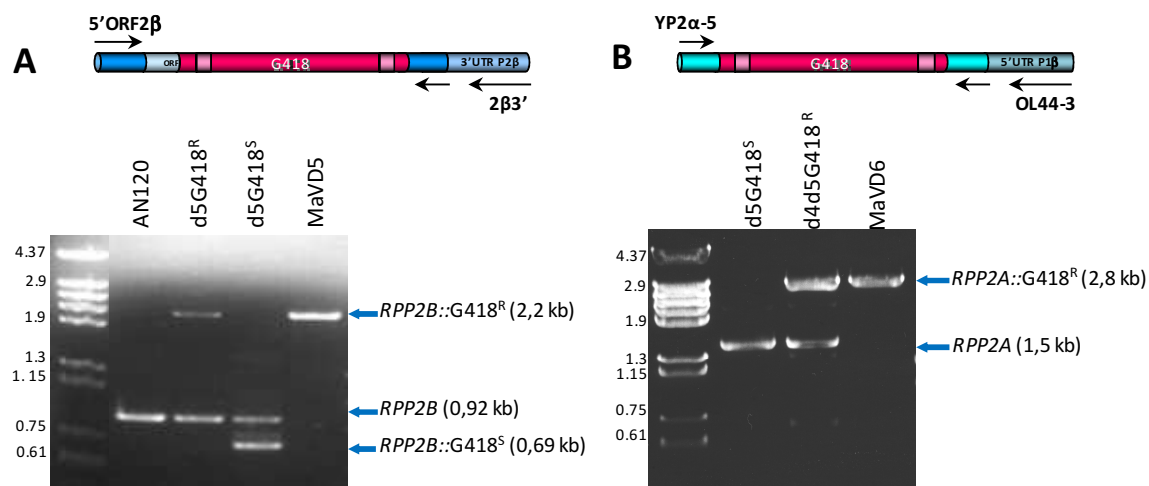


Figura IV.3 Obtención de la cepa d4d5. Se muestra el seguimiento de la cepa AN120 durante su conversión en d4d5, la amplificación mediante PCR de los genes *RPP2B* (en **A**) y *RPP2A* (en **B**) se realizó usando en ambos casos, uno de los oligonucleótido usados para amplificar el módulo de interrupción (5'ORF2β Y YP2α-5) y otro oligonucleótido que hibrida en la región 3'UTR del gen, más alejado de donde hibrida el *cassette* (OL44-3; 2β3'). La secuencia de los oligonucleótidos se especifica en la tabla III.3. En **A**, se observa la amplificación de *RPP2B* en el diploide parental (AN120), después de insertar el módulo de reemplazamiento que la hace resistente a G418 (d5G418^R) y después de la eliminación del *KanMX4* (d5G418^S). En **B**, se muestra la amplificación del gen *RPP2A* en la cepa d5G418^S de partida y después de la delección del gen *RPP2A* (d4d5G418^R).

El clon seleccionado fue incubado en condiciones de esporulación, y se separaron las esporas en placas de YEPD. De cada una de las 4 esporas germinadas (Figura IV.4.A) se analizó la resistencia/sensibilidad a G418; puesto que tanto el mutante haploide simple D4 como el doble mutante D45 han de ser resistentes al antibiótico (Figura IV.4.B), se observó mediante Western blot de extractos totales (S30) la presencia/ausencia de la proteína P2α empleando un anticuerpo monoclonal para esta proteína (Figura IV.4.C). Finalmente se determinó el tipo sexual (a o α) a los 6 clones haploides D45 obtenidos (Figura IV.4.D). De esta forma se obtuvo dobles mutantes haploides D45 de ambos tipos sexuales. A partir de ellos, se obtuvieron por conjugación el doble mutante diploide que no expresa las proteínas P2 (cepa DD45)

De manera similar (datos no mostrados) se obtuvieron 12 clones haploides D67 de los cuales 5 fueron del tipo sexual a y 7 del tipo α, a partir de los cuales se obtuvo por conjugación el doble mutante diploide que no expresa las proteínas P1 (cepa DD67).

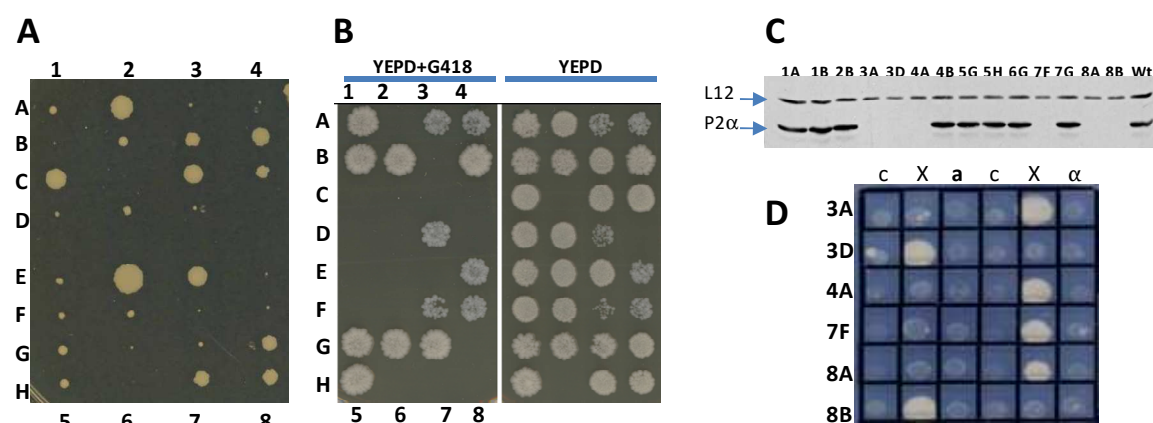


Figura IV.4 Identificación de los clones D45 haploides. (A) germinación de 4 esporas ([A - D] y [E - H]) correspondiente a diferentes tétradas (1 a 8), germinadas en placas de YEPD. (B) comprobación de la resistencia a G418 en cada una de las esporas germinadas. (C) detección mediante Western blot de la proteína P2α en las esporas resistentes a G418, usando el anticuerpo monoclonal 1BE3, específico para esta proteína y como control de carga se empleó el anticuerpo 1AD7, que reconoce específicamente la proteína ribosómica L12. (D) identificación del tipo sexual de los 6 clones D45 haploides obtenidos, mediante cruce con las cepas 17/17 (tipo sexual α) y 17/14 (tipo sexual a).

IV.2 ANÁLISIS DE LA ESPORULACIÓN EN LOS DOBLES MUTANTES DD45 Y DD67

Para estudiar si los diploides DD45 y DD67 eran capaces de esporular se cultivaron en medio SPM a 30°C. La esporulación se siguió por microscopía óptica, visualizando las muestras diariamente hasta los 7 días de incubación. Los resultados obtenidos reflejaron que estas cepas mutantes no esporulan, a diferencia de la cepa parental AN120 (Figura IV.5), confirmando los resultados preliminares descritos anteriormente para el fondo genético W303 [Remacha *et al.*, 1995a].

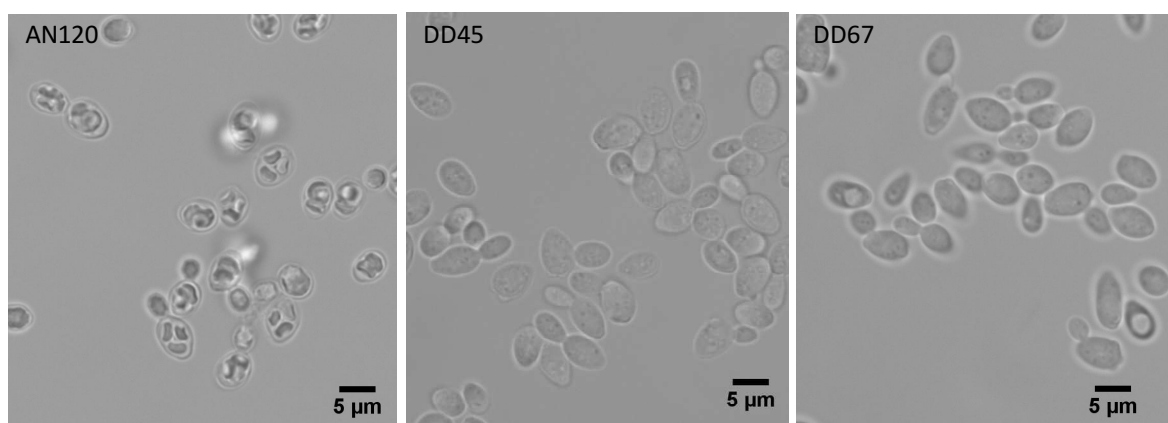


Figura IV.5 Esporulación en ausencia de P1/P2. Observación en microscopio de campo claro de células diploides de las cepas indicadas, incubadas en SPM durante 4 días.

IV.2.1 Segregación nuclear durante la esporulación

Para saber hasta qué punto progresaba la esporulación en ausencia de P1/P2, se caracterizó en primer lugar la meiosis. Las células incubadas en medio SPM se tiñeron con DAPI, para visualizar los núcleos por microscopía de fluorescencia, para ello se tomaron muestras cada 2 horas hasta alcanzar las 12 primeras horas. Las observaciones microscópicas mostraron que a las 6 horas de incubación en SPM la cepa parental (AN120) comienza a presentar 2 núcleos, lo que es indicativo de que ha tenido lugar la primera división meiótica. A diferencia de la cepa parental, a partir de las 4 horas de incubación los mutantes DD45 y DD67 comienzan a mostrar fluorescencia dispersa en forma de gránulos por todo el citoplasma (Figura IV.6), no llegándose a observar la división nuclear.

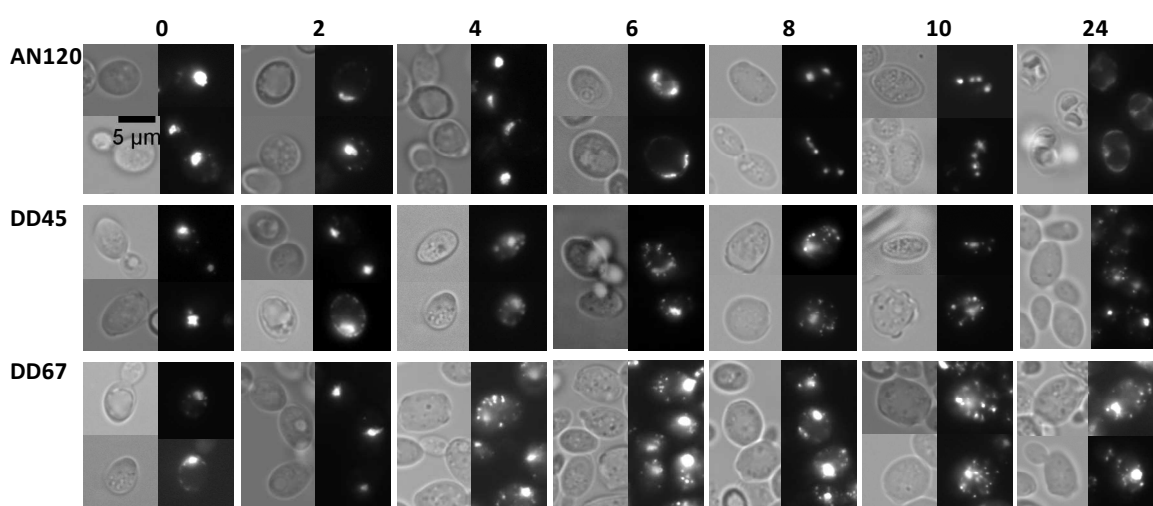


Figura IV.6 Seguimiento de la segregación nuclear durante la esporulación. Microscopía en campo claro y de fluorescencia del: parental diploide AN120, y los mutantes diploides DD45 y DD67. Las células fueron incubadas en SPM y seguida la progresión de esporulación durante la 12 primeras horas mediante visualización microscópica de los núcleos teñidos con DAPI (meiosis I y II). Se muestran los tiempos de 2 a 10 horas de incubación y el tiempo 0 horas que corresponde a las células antes de ser transferidas al medio de esporulación; además, el tiempo 24 horas donde se pueden observar las tétradas formadas en el diploide parental AN120.

Para determinar si la fluorescencia dispersa observada por el citoplasma de los mutantes DD45 y DD67 es debida al ADN nuclear o al ADN mitocondrial (ADNmit), las células fueron transformadas con el plásmido pTV100U, el cual expresa la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a un péptido señal para el transporte mitocondrial (mitGFP) [Westermann y Neupert, 2000]. Las células transformadas fueron incubadas en condiciones de esporulación y después de 4 horas, fueron teñidas con DAPI y observadas mediante

microscopía de fluorescencia. Los resultados (Figura IV.7) demuestran que no existe correlación entre la fluorescencia del DAPI y la de GFP, por lo que no toda la fluorescencia dispersa en el citoplasma corresponde a las mitocondrias. Además, se observó una clara diferencia en el patrón de distribución mitocondrial entre las cepas mutantes y la parental. Así, mientras que la cepa parental AN120 presenta una distribución de mitocondrias punteada hacia la periferia, característico de las levaduras en fase estacionaria de crecimiento [Miyakawa *et al.*, 1984], las mitocondrias de las cepas mutantes DD45 y DD67 presentan una distribución mucho más aleatoria y desordenada por todo el citoplasma de la levadura.

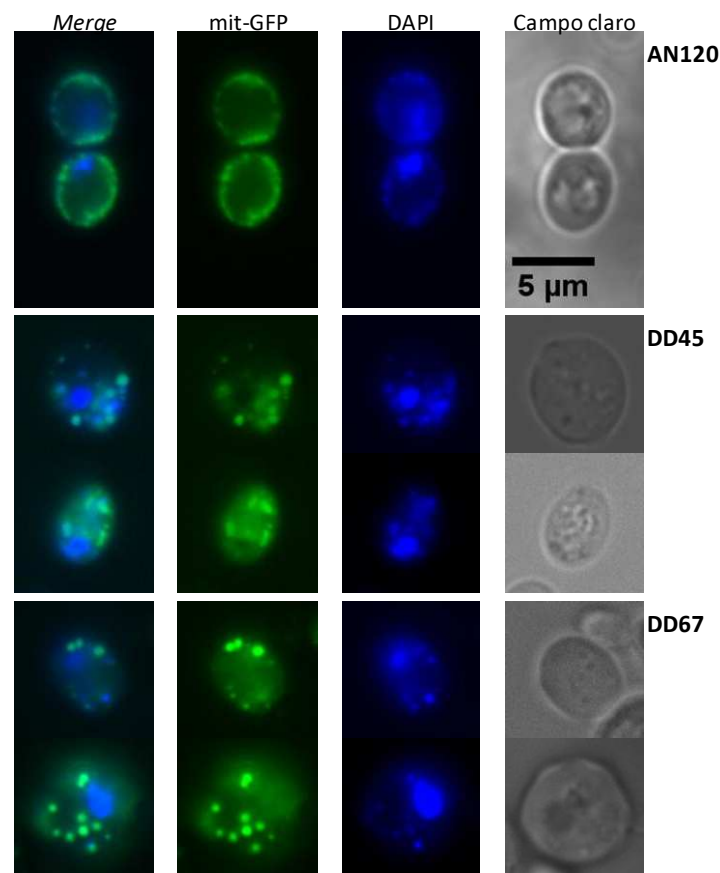


Figura IV.7 Distribución de las mitocondrias durante la esporulación. El diploide parental (AN120) y los diploides mutantes DD45 y DD67 fueron incubados en condiciones de esporulación durante 4 horas, la fluorescencia verde corresponde a las mitocondrias marcadas con GFP (mitGFP) y la azul al ADN nuclear y mitocondrial tenido con DAPI; se muestra además, imágenes de las células en campo claro.

Para que se desarrolle el proceso de esporulación en *S. cerevisiae* es necesario que las levaduras diploides se encuentren en ausencia de una fuente de nitrógeno, en presencia de una fuente de carbono no fermentable (como acetato) y que posean actividad respiratoria mitocondrial [Neiman, 2005]. Si bien los dos primeros requisitos claramente se cumplían con

las condiciones de esporulación empleadas, el anómalo patrón mitocondrial que mostraban los mutantes DD45 y DD67 nos hizo plantear que estas cepas tuviesen algún defecto en la actividad mitocondrial, circunstancia que influiría negativamente en el desarrollo de la esporulación. Para aclarar esto se cultivaron las levaduras en un medio que contenía glicerol y etanol (YEPGE) como fuentes de carbono no fermentables. Los resultados (Figura IV.8) revelaron que estábamos usando cepas deficientes en el metabolismo respiratorio ya que fueron incapaces de crecer en presencia de fuentes de carbono no fermentativas, por lo que son consideradas cepas *petite*.

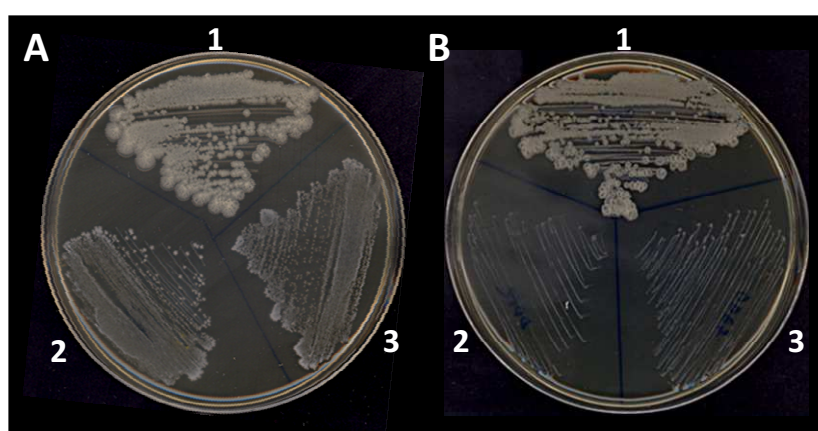


Figura IV.8 Competencia respiratoria en ausencia de las proteínas P. Los diploides DD45 (2), DD67 (3) y el parental AN120 (1), se cultivaron en condiciones fermentativas, con glucosa como fuente de carbono (YEPD en **A**) y en condiciones respiratorias con glicerol-etanol como fuentes de carbono (YEPGE en **B**). Las placas fueron incubadas durante 5 días a 30 °C.

Este resultado nos hizo replantear el estudio de la esporulación en ausencia de proteínas P, ya que en estas circunstancias los resultados obtenidos no sabíamos si eran debidos a la ausencia de las proteínas P o a la pérdida de la función mitocondrial.

IV.3 LOS DOBLES MUTANTES DD45 Y DD67 Y EL FENOTIPO *petite*

En primer lugar nos planteamos estudiar cómo/cuando se habían generado estos mutantes *petite*, para ello se cultivaron en medio YEPGE las cepas haploides utilizadas para generar las cepas diploides DD45 (clones 2 y 3) y DD67 (clones 6 y 8), comprobando que ninguna era capaz de crecer (ver Figura IV.9), por lo que el fenotipo *petite* ya estaba en las esporas segregadas. Puesto que en las segregaciones obtuvimos más esporas D45 y D67, cultivamos todas ellas en las mismas condiciones, para ver si alguna tenía actividad

respiratoria (Figura IV.9). Para nuestra sorpresa el 100% de los clones D45 (6 de 6) (Figura IV.9.A) y el 83% de los D67 (10 de 12) (Figura IV.9.B) resultaron ser *petite*.

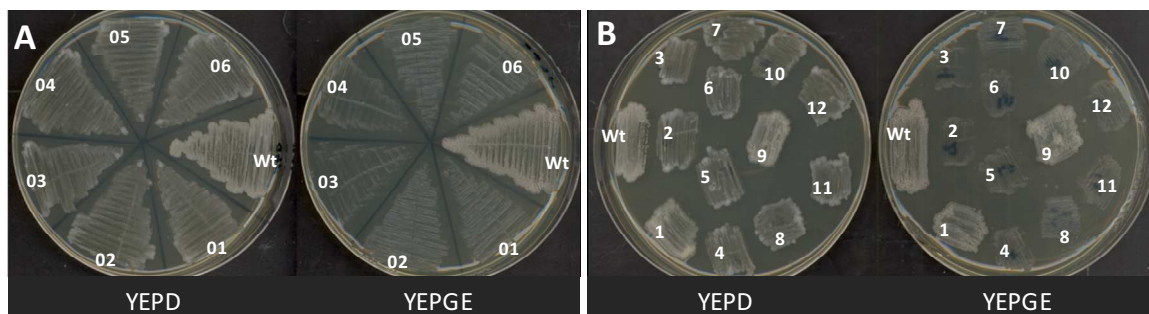


Figura IV.9 Fenotipo *petite* en los clones haploides de los mutantes D45 y D67. Crecimiento en placas de YEPD e YEPGE de los 6 clones haploides de D45 (A) y los 12 de D67 (B) obtenidos mediante esporulación. En la figura B, se observa que los clones 1 y 9 fueron capaces de desarrollarse en la placa que contenía glicerol y etanol como fuente de carbono.

Para continuar con el objetivo inicial de este trabajo, que es estudiar la esporulación en ausencia de las proteínas P, decidimos aislar nuevamente dobles mutantes D45 con competencia respiratoria.

IV.4 OBTENCIÓN DE UN MUTANTE D45 *grande*

IV.4.1 Obtención del mutante D45 por esporulación/germinación

En el caso de las cepas D45, tal como se ha comentado anteriormente, todos los clones haploides dobles mutantes D45 obtenidos a partir del diploide heterocigoto d4d5 resultaron ser *petite* (D45.₀₁ → D45.₀₆). Para tratar de obtener un D45 con competencia respiratoria se hicieron nuevas disecciones de tétradas en placas con medio YEPD (glucosa como fuente de carbono). El posterior análisis de las mismas mostró que ninguna de las 22 colonias que resultó ser D45 fue capaz de desarrollarse en medio YEPGE.

En vista de ello, se diseccionaron tétradas germinando las esporas directamente en placas con YEPGE. De las 27 tétradas analizadas ninguna de las esporas germinadas resultó ser D45 (Figura IV.10.B). Estos resultados sugieren que las esporas D45 no tienen mitocondrias funcionales y por tanto, son incapaces de germinar en YEPGE. Sin embargo, el análisis al microscopio de las esporas inoculadas que no formaron colonias visibles (31

esporas en total) mostraron que en general sí habían germinado y se habían dividido 2-5 veces antes de cesar el crecimiento (datos no mostrados).

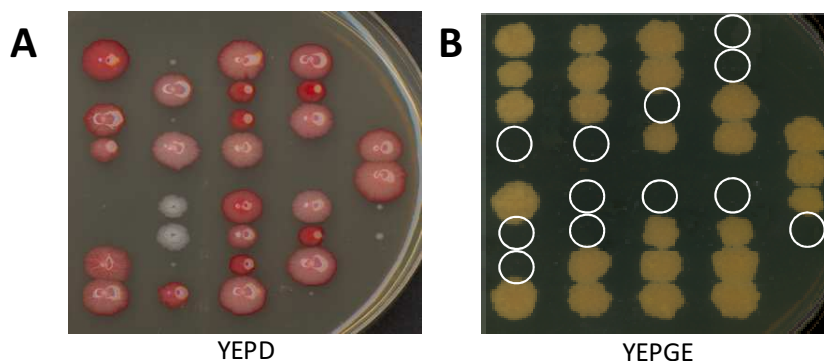


Figura IV.10 Mutante D45 *petite* por esporulación/germinación. Tétradas del mutante heterocigoto diploide (d4d5), disectadas y germinadas en placas con medio YEPD (A) y en YEPGE (B). En A, los haploides D45 se muestran blancas en la tinción con cloruro de 2,3,5 triphenyltetrazolium [Ogur *et al.*, 1957], lo que indica que son *petite*, las células rojas presentan metabolismo respiratorio. En B, en los lugares donde no aparecen colonias visibles y que se encuentran señalados con círculos, solo se producen de 2 a 5 divisiones.

Estos resultados nos hicieron pensar que la ausencia de las proteínas P2 hace que las esporas pierdan la competencia respiratoria de sus mitocondrias durante el proceso de esporulación/germinación.

IV.4.2 Obtención del mutante D45 mediante transformación

Para determinar si la conversión en *petite* en las cepas D45 estaba relacionada con el proceso de esporulación y/o germinación de las esporas, decidimos construir los dobles mutantes D45 del tipo sexual α y α por separado a partir de cepas haploides, para así obviar estos procesos. Con este fin, a partir de las cepas haploides YP458 (α) e YP459 (α) se siguió el procedimiento de reemplazamiento génico anteriormente descrito (apartado IV.1).

En un primer intento los mutantes fueron seleccionados directamente en placas con YEPGE+G418; de esta manera se pretendía garantizar que todos los transformantes D45 poseyeran competencia respiratoria. Sin embargo, con esta estrategia no se obtuvo ningún transformante; por tanto, una nueva transformación fue seleccionada en placas con medio YEPD+G418 y posteriormente se comprobó mediante crecimiento en YEPGE, cuál de los D45 era capaz de respirar. Los resultados (Figura IV.11) mostraron de nuevo que la totalidad (60/60) de los transformantes D45 analizados fueron *petite* (D45.₁₀₁→D45.₁₆₀). Estos

resultados confirmaban que la presencia de las proteínas P2 es necesaria para que las levaduras lleven a cabo una correcta actividad respiratoria.

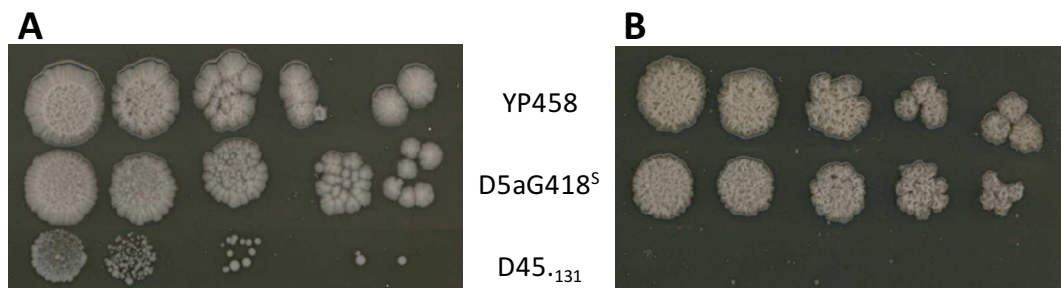


Figura IV.11 Obtención de un mutante D45 *petite* por transformación. A partir de cultivos en fase exponencial de las cepas: parental haploide tipo sexual *a* (YP458), D5 obtenida por interrupción de *RPP2B* a partir de la haploide antes mencionada (D5aG418^S) y la D45 obtenida por interrupción de *RPP2A* en la D5aG418^S (D45_{.131}), se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-5} DO₆₀₀) y se inocularon 4 μ l de cada dilución en placas con medio YEPD (A) y en YEPGE (B) e incubadas 5 días a 30°C.

IV.4.3 Obtención de un mutante condicional de D45 (D45dGP5)

Para caracterizar como se relaciona la ausencia de las proteínas P2 y la formación de *petite*, se ideó crear una cepa que exprese condicionalmente una proteína P2 de manera que se pueda dirigir la expresión de esta proteína.

Para crear este mutante condicional se siguió el procedimiento esquematizado en la figura IV.12. La cepa D5aG418^S (haploide *a* sensible a geneticina) descrita anteriormente (apartado IV.4.2), fue transformada con el plásmido pBG45/70. Este plásmido tiene clonado el gen *RPP2B* bajo el control del promotor *GAL1* [Bermejo, 1992]. Después de comprobar la correcta expresión en galactosa y no en glucosa de la proteína P2 β (Figura IV.12), se deleccionó la copia genómica de *RPP2A*, que codifica la proteína P2 α , tal como se ha descrito en el apartado IV.1. La selección de los transformantes se realizó en presencia de galactosa (de esta manera se garantizó la expresión del gen *GAL1-RPP2B*) y suplementado con geneticina (para seleccionar los transformantes con el gen *RPP2A* interrumpido). La cepa así obtenida, denominada D45dGP5, no posee los genes nativos que codifican las dos proteínas P2 (P2 α y P2 β), pero siempre que esté creciendo en galactosa se comportará como un mutante simple (D4) ya que la proteína P2 β se expresa condicionalmente a partir del gen clonado bajo el promotor *GAL1* en el plásmido pBG45/70.

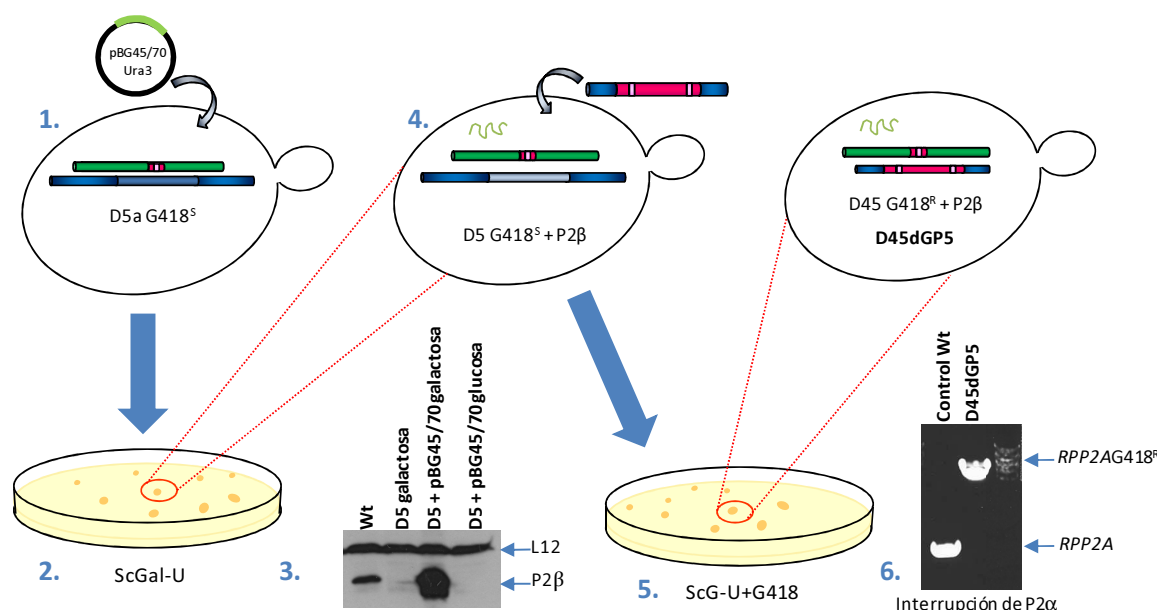


Figura IV.12 Esquema del proceso seguido para la obtención del mutante D45 condicional (D45dGP5). 1. Transformación de la cepa D5a de partida con el plásmido pBG45/70, 2. Selección de transformantes en placas con galactosa y sin uracilo; 3. Western blot a partir de S30 de las cepas indicadas en la figura, utilizando anticuerpos frente a la proteína P2β (1AA9) y la proteína ribosómica L12 (1AD7) este último usado como control de carga. 4. Transformación con el segundo módulo de reemplazamiento génico para RPP2A, 5. Selección de los mutantes en placas con galactosa, G418 y ausencia de uracilo y 6. Comprobación mediante PCR de la correcta interrupción de RPP2A, la pareja de oligonucleótidos empleada fue especificada en la figura IV.3 y la secuencia está detallada en la tabla III.3.

Para determinar la capacidad de crecer en fuentes de carbono no fermentable del mutante condicional cuando se convierte en D45, se inocularon aproximadamente 200 células en placas de YEPGE, YEPD e YEPGal a partir de un cultivo crecido en presencia de galactosa (SCGal-U) hasta fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,6$). Los resultados (Figura IV.13) mostraron que al cabo de 5 días de incubación, fue posible apreciar la presencia de colonias en las placas de YEPD e YEPGal pero no en YEPGE, observándose que las colonias desarrolladas en placas con galactosa eran de mayor tamaño que las observadas en placas con glucosa, diferencia que se debe a que las células creciendo en galactosa se comportan como un mutante simple (D4) mientras que las células que están desarrollándose en glucosa, una vez que son transferidas a este medio, dejan de expresar P2β y se convierten en un doble mutante (D45), con un tiempo de duplicación aproximadamente dos veces mayor al del mutante D4 [Remacha *et al.*, 1995a].

En cuanto a la placa que contenía glicerol y etanol como fuente de carbono (Figura IV.13), no se observó la aparición de colonias ni siquiera después de 21 días de incubación. Este resultado nos estaba indicando que durante el crecimiento en la placa, el mutante

D45dGP5 no sólo se transforma en D45 sino que además, durante las generaciones necesarias para que la colonia sea visible, este D45 pierde la competencia respiratoria convirtiéndose en *petite*; por lo tanto, deja de crecer en presencia de fuentes de carbono no fermentativas.



Figura IV.13 Crecimiento del mutante condicional (D45dGP5) con diferentes fuentes de carbono. Se inocularon aproximadamente 200 células de un cultivo D45dGP5 crecido en medio con galactosa hasta fase exponencial ($1 \text{ Unidad de } A_{600} = 6,5 \times 10^7 \text{ células/ml.}$) en placas con medios de cultivo que contienen galactosa (YEPGal), glucosa (YEPD) y glicerol-etanol (YEPGE). Las placas de YEPGal e YEPD fueron incubadas durante 5 días a 30°C , mientras que las placas de YEPGE fueron incubadas durante 21 días a la misma temperatura.

IV.5 LA AUSENCIA DE LAS PROTEÍNAS P2 Y EL DEFECTO EN LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

Todos los intentos fallidos para obtener un mutante D45 capaz de crecer en YEPGE, claramente indican que en ausencia de P2 las levaduras no son viables por su incapacidad de respirar. La obtención del mutante D45dGP5 podría permitirnos profundizar en el estudio de esta relación, observando la progresión del mutante desde D4 hasta D45 *petite*.

IV.5.1 Conversión del mutante condicional D4 *grande* en D45 *petite*

Para determinar si el momento en que la cepa D45 se convierte en *petite* coincide con la desaparición de P2 β , se hizo el seguimiento del mutante condicional durante su crecimiento en glucosa, relacionando la desaparición de la proteína P2 β y la tasa de conversión en *petite*. La metodología empleada (esquemática en la Figura IV.14) fue la siguiente: a partir de un cultivo del mutante condicional en galactosa (SCGal-U) en fase exponencial, se inoculó en medio YEPD líquido a una DO inicial de 0,02. Este cultivo fue

incubado a 30°C durante 72 horas (con agitación constante) y periódicamente se registró la velocidad de crecimiento, la disminución de la proteína P2 β y la formación en *petite*. El cálculo de la velocidad de crecimiento se realizó haciendo mediciones de la DO del cultivo a 600 nm durante todo el transcurso del experimento; a fin de evitar la entrada de las células en fase estacionaria de crecimiento, el cultivo debió ser refrescado con medio YEPD (a 30°C). La disminución de la proteína P2 β se siguió mediante Western blot del lisado total y revelado con anticuerpos monoclonales específicos para esta proteína. Por último, para estimar la tasa de conversión en *petite*, se inocularon aproximadamente 400 células en placas de YEPD e YEPGal (cada una por duplicado). El cálculo del porcentaje de *petite* se realizó basándonos en el hecho de que en las placas de YEPGal únicamente formarán colonias las células con competencia respiratoria (porcentaje de células *grande*), mientras que en las placas de YEPD, crecerán todas las células inoculadas (el 100% de las células) [Douglas y Pelroy, 1963; Bhat y Hopper, 1991; Donnini *et al.*, 1992].

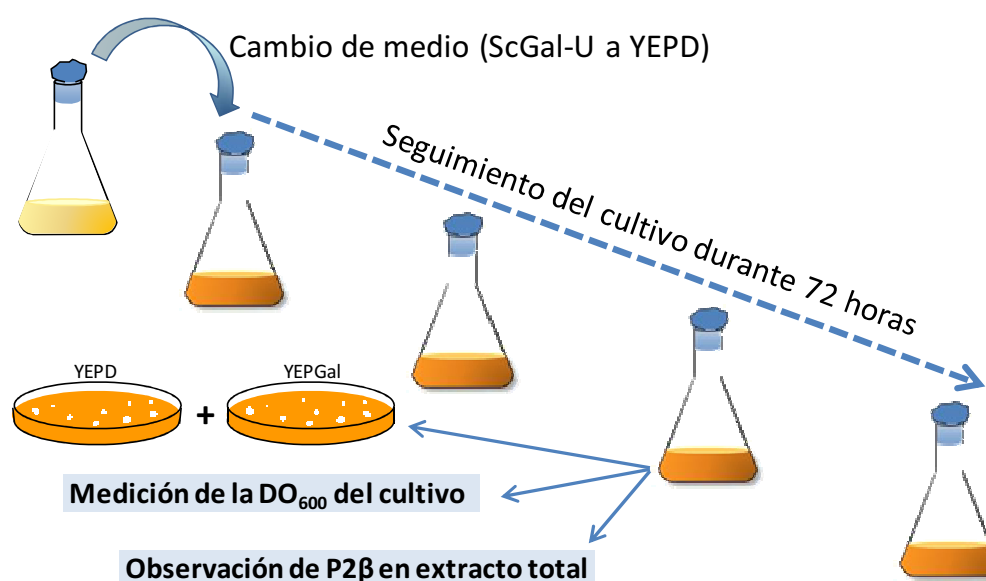


Figura.IV.14 Esquema del seguimiento de la conversión del mutante D45dGP5 *grande* en D45 *petite*.

La transformación del mutante condicional de D4 a D45 ocurre a medida que las células se dividen en medio con glucosa como fuente de carbono. En la figura IV.15.A, se puede observar como el cultivo se convierte progresivamente en D45, ocurriendo la desaparición de la proteína P2 β a medida que transcurre el tiempo de las células cultivadas en glucosa. La densitometría de las bandas detectadas mediante el Western blot demuestra

que a las 12 horas el cultivo ha perdido un tercio de la proteína P2 β inicial y a las 24 horas la cantidad de proteína P2 β remanente solo alcanza el 1% de la inicial. No obstante, es al cabo de 36 horas cuando la proteína P2 β ya no puede ser detectada. La Figura IV.15.B, muestra como el cultivo va cambiando la velocidad de crecimiento a medida que se pierde la proteína P2 β ; durante las etapas iniciales (0-12 horas) el tiempo de generación para el mutante condicional es de aproximadamente 180 min. A medida que transcurre el crecimiento en glucosa, el tiempo de duplicación se alarga; de manera que a las 24 horas la velocidad de crecimiento es similar a la descrita para un D45 (236 min.) [Remacha *et al.*, 1995a]; sin embargo, la velocidad con la que esta levadura se divide no se estabiliza hasta transcurridas 48 horas creciendo en glucosa con un tiempo de generación de aproximadamente 390 minutos.

En la Figura IV.15.C, se observa como la tasa de conversión en *petite* también aumenta de forma constante a medida que desaparece la proteína P2 β ; de manera que a partir de las 48 horas el cultivo está compuesto (en casi su totalidad) por células que han perdido la capacidad para respirar. Esto parece indicar que la estabilización en el tiempo de generación está ocasionada porque el cultivo ha alcanzado el fenotipo final de células D45 *petite*.

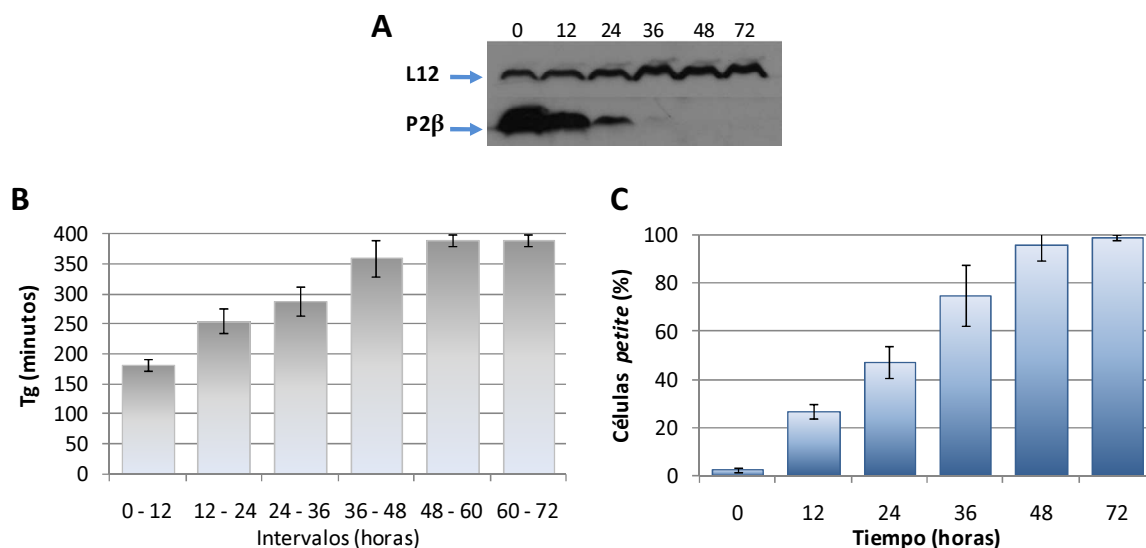


Figura.IV.15 Conversión del mutante condicional D45dGP5 en mutante D45. 12, 24, 36, 48 y 72 corresponde a los tiempos durante el cual el cultivo del mutante condicional D45dGP5 fue incubado en medios con glucosa como fuente de carbono, 0 corresponde al cultivo en galactosa. **(A)** Western blot de extracto total del mutante condicional D45dGP5 revelado con los anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína P2 β (1AA9) y L12 (1AD7) usada como control de carga. **(B)** el tiempo de generación (Tg) calculados en intervalos de tiempo de 12 horas. **(C)** porcentaje de células que se han convertido en *petite* a medida que transcurren las generaciones en glucosa.

Las tasas de conversión en *petite* sugieren que las proteínas P2 son necesarias para el mantenimiento de la actividad respiratoria mitocondrial. No obstante, y debido a que estos valores son semicuantitativos, decidimos realizar medidas de respiración mucho más exactas que nos permitieron confirmar estos resultados.

IV.5.2 Actividad respiratoria en las mitocondrias en ausencia de las proteínas P2

El ensayo consistió en medir la actividad respiratoria de mitocondrias extraídas de cultivos creciendo durante 12, 24, 36, 48 y 84 horas en glucosa, así como del cultivo creciendo en galactosa (Tiempo 0) el cual va a reflejar la respiración basal del mutante. Como controles se emplearon mitocondrias de células mutantes simples (D4) creciendo tanto en galactosa como en glucosa (12 horas). La cepa D4 se incluyó como control a fin de eliminar la posibilidad de que la ausencia de solo una proteína P2 pudiera ocasionar un cambio en la capacidad de respiración del mutante.

Los ensayos de respiración se realizaron siguiendo el protocolo de Tomas y colaboradores [Tomas *et al.*, 2004]. Puesto que las mitocondrias de levadura son capaces de oxidar el NADH exógeno a $\text{NAD}^+ + \text{H}^+$ (para generar el potencial de membrana usado en la producción del ATP) la disminución de la fluorescencia será proporcional a la tasa de actividad mitocondrial ya que la forma oxidada (NAD^+) no fluoresce.

En los resultados obtenidos (Figura IV.16), lo primero que se observó fue que tanto las mitocondrias del mutante condicional D45dGP5 como del mutante simple D4 (Figura IV.16.A), cultivadas en galactosa presentan una tasa de respiración bastante superior a la observada para el resto de las mitocondrias analizadas. Esto es debido a que durante el crecimiento en galactosa, las levaduras poseen todos los complejos respiratorios activos. Una vez que el cultivo pasa de galactosa a glucosa, todos estos complejos respiratorios se reprimen; por lo tanto, a partir de las 5 horas de crecimiento en glucosa las levaduras D4 muestran la tasa de respiración basal en condiciones fermentativas, que se mantiene mas o menos constante a lo largo del tiempo (Figura IV.16.A). Por el contrario, en el mutante condicional D45dGP5 a medida que se convierte en D45, sus mitocondrias van perdiendo la capacidad para oxidar el NADH, hasta el punto de que la tasa de respiración es prácticamente nula al cabo de 84 horas (Figura IV.16.B). Esta disminución en la actividad respiratoria no es a consecuencia de una menor cantidad de mitocondrias en el ensayo, ya que el Western blot de las diferentes

mitocondrias empleadas mostró la misma cantidad de la proteína mitocondrial porina en todas ellas (Figura IV.16.C).

Para comprobar que la disminución de la fluorescencia del NADH era a consecuencia del consumo por las mitocondrias al ensayo de respiración se añadió ADP y distintos compuestos inhibitorios de la actividad respiratoria mitocondrial (Figura IV.16.E). En presencia de carboxiatractilósido (CAT) u oligomicina, el consumo de NADH disminuye a niveles similares a las condiciones de ausencia de ADP y la adición de antimicina A produce una total paralización de la respiración (Figura IV.16.D); por lo tanto, estos resultados confirman que con estos ensayos se está midiendo la actividad respiratoria de las mitocondrias purificadas.

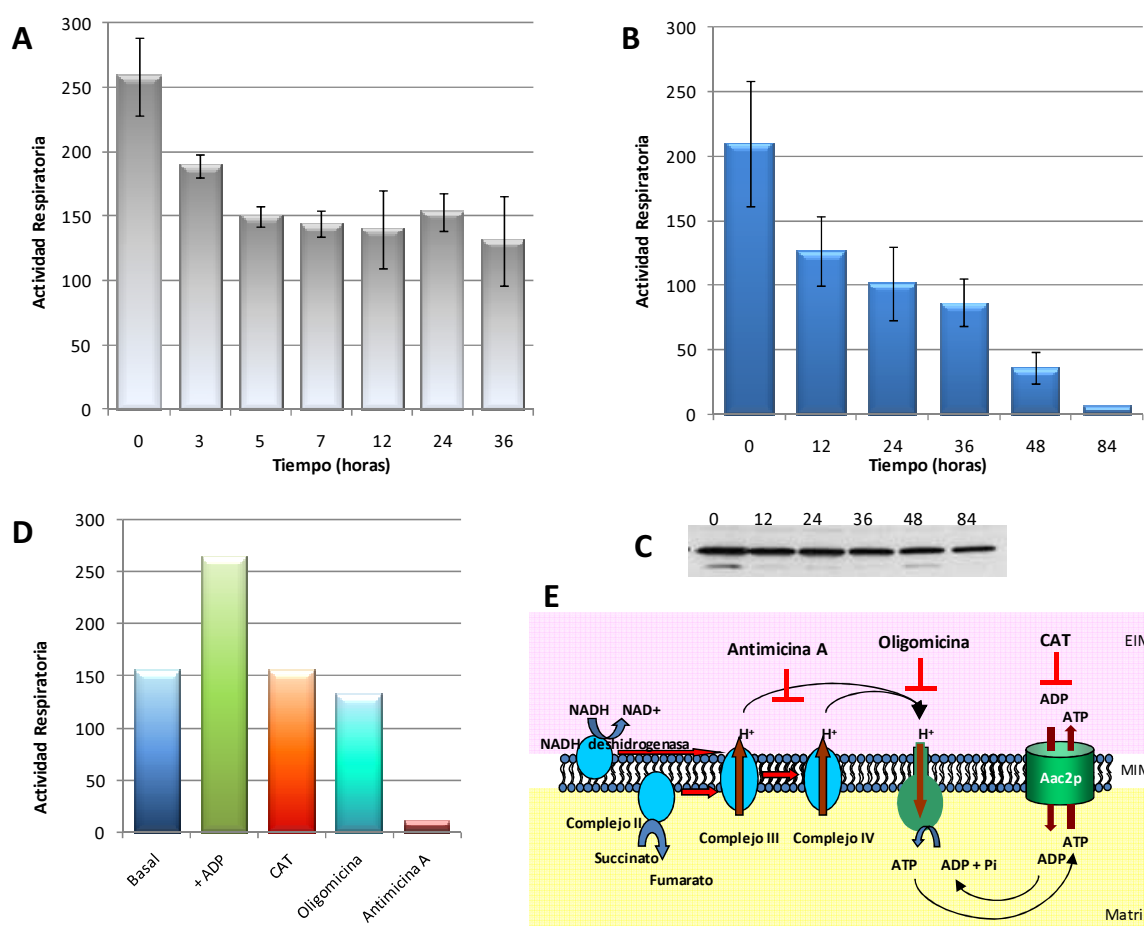


Figura.IV.16 Actividad respiratoria del mutante D45dGP5 a medida que se convierte en D45. (A y B) actividad respiratoria de mitocondrias purificadas, extraídas de cultivos del mutante simple D4 (A) y del mutante D45dGP5 (B) creciendo durante diferentes tiempos en glucosa; el tiempo 0 corresponde a cultivos creciendo en medios con galactosa. (C) Western blot de 20 µg de las mitocondrias del D45dGP5 empleadas en el ensayo de respiración, revelado con el anticuerpo monoclonal anti-porina. (D) inhibición de la actividad respiratoria de mitocondrias purificadas a partir de células del mutante condicional con 12 horas creciendo en glucosa. (E) sitios de acción de los inhibidores empleados. La actividad respiratoria de las mitocondrias se representa en nanomoles de NADH consumidos por minuto y por miligramo de proteínas.

Estos resultados nos muestran que la presencia de las proteínas P2 en las levaduras, es indispensable para que se desarrolle la respiración. No obstante, el daño en el proceso respiratorio no se realiza de forma inmediata; por el contrario, se observa que desde el momento en el que apenas es detectada la proteína P2 β , aproximadamente a las 24 horas (apartado IV.5.1; Figura IV.15.C), hasta que las células dejan completamente de respirar a las 84 horas (Figura IV.16.A), transcurren entre 10 ó 12 generaciones, período en el cual debe ocurrir el daño en la mitocondria.

IV.5.3 Caracterización del fenotipo *petite* en el mutante D45

IV.5.3.1 El fenotipo *petite* no revierte

Si los mutantes D45 dejan de respirar cuando las proteínas P2 están ausentes, nos planteamos si este efecto es irreversible o bien la reexpresión de las proteínas P2 revierte el fenotipo *petite*. Para ello, se transformó un mutante D45 *petite* (D45.₀₃) con plásmidos que expresaban las proteínas P2 α ó P2 β (pFL38P2 α y pFL38P2 β). Después de comprobar mediante Western blot la expresión de las proteínas P2 (Figura IV.17.A), las células fueron inoculadas en placas de medio con glicerol-etanol, glucosa y galactosa (Figura IV.17.B). Después de 5 días de incubación a 30°C se comprobó que el mutante no fue capaz de crecer en las placas que contenían galactosa o glicerol-etanol como fuentes de carbono, lo que indica que la actividad mitocondrial no se recupera con la expresión de las proteínas P1/P2.

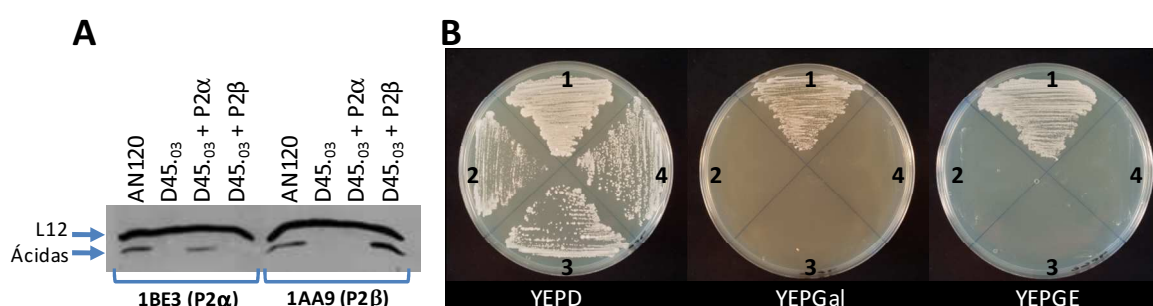


Figura IV.17 El fenotipo *petite* no revierte por reexpresión de las proteínas P1/P2. (A) western blot de lisado total revelado con los anticuerpos monoclonales contra las proteínas P2 α (1BE3), P2 β (1AA9) y la proteína ribosómica L12 (1AD7) como control de carga. (B) placas de YEPD, YEPGal e YEPGE inoculadas con el parental silvestre (1) y el mutante D45.₀₃ antes (2) y después de transformado con los plásmidos pFL38P2 α (3) y pFL38P2 β (4). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 5 días.

IV.5.3.2 Los mutantes D45 *petite* son ρ^-

El ADN mitocondrial (ADNmit) sólo codifica 2 ARN mito-ribosómicos y 8 proteínas [Locker *et al.*, 1981]; el resto de los componentes de la mitocondrias están codificados en el genoma nuclear. Por esta razón, el fenotipo observado en los mutantes D45 podría estar relacionado con la expresión o falta de función de algún gen nuclear o algún defecto en el ADN mitocondrial.

Para distinguir entre las dos posibilidades, se diseñó un experimento en donde se conjugó un haploide D45 *petite* (D45.₀₃) con una cepa haploide silvestre hecho *petite* (ρ^0) por crecimiento en presencia de bromuro de etidio (Wt ρ^0), un agente que ocasiona la pérdida del ADN mitocondrial [Goldring *et al.*, 1971]. Puesto que los diploides obtenidos resultaron ser *petite* (Figura IV.18), podemos concluir que el mutante D45 en estudio tiene algún daño relacionado con el ADNmit, ya que los genes nucleares aportados por el haploide silvestre *petite* no recuperaron la actividad mitocondrial. No obstante, puesto que la microscopía de fluorescencia (apartado IV.2.1) parecía indicar que los mutantes contenían ADN mitocondrial, ya que existía una correlación (aunque no completa) entre el marcador de mitocondrias (mitGFP) y el DAPI (Figura IV.7), concluimos que los mutantes D45 *petite* eran células del tipo ρ^- (y no ρ^0). Esto nos impulsó a analizar el ADN mitocondrial y su expresión.

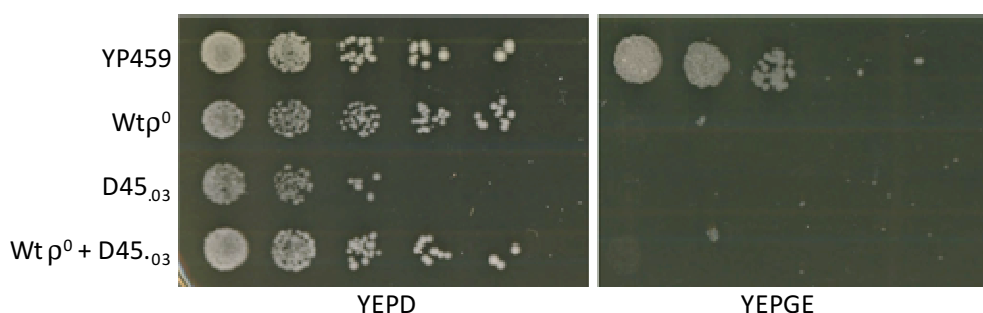


Figura IV.18 Daño del genoma mitocondrial en el mutante D45. Se muestra el crecimiento en placas en condiciones fermentativas (placa de YEPD) y estrictamente respiratorias (YEPGE) de: un haploide silvestre (YP459), el haploide silvestre hecho *petite* por tratamiento con bromuro de etidio a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ (Wtp⁰), el D45 *petite* obtenido mediante esporulación (D45.₀₃) y el diploide formado entre el Wt ρ^0 + D45.₀₃. A partir de los cultivos en fase exponencial, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-5} DO₆₀₀) y se inocularon 4 μl de cada dilución en placas con medio YEPD e YEPGE e incubadas durante 5 días a 30°C.

IV.5.3.3 El ADN mitocondrial.

El tamaño del genoma mitocondrial de las levaduras *petite* puede variar dependiendo de la dimensión del segmento de ADNmit que haya perdido, pudiendo ser tan pequeño como el 0,1% del genoma mitocondrial de una célula *grande* o tan grande que alcance el 80% [Locker *et al.*, 1981]. Para saber la integridad del genoma mitocondrial en los mutantes D45 *petite*, se extrajo ADNmit y se digirió cada una de las diferentes muestras extraídas con la enzima de restricción *EcoRV* [Defontaine *et al.*, 1991]. El patrón de restricción observado (Figura IV.19), muestra diferencias bastante marcadas entre el ADNmit de las células con capacidad para respirar y las que no. Mientras que los diferentes clones Wt presentan un patrón de bandas definido, los D45 *petite* no lo muestran; por el contrario, posee el patrón característico de productos de ADN degradados.

Más interesantes son las diferencias observadas en el ADNmit entre los mutantes condicionales estudiados. Cuando el mutante D45dGP5 se comporta como un D4 (crecimiento en galactosa), posee el mismo patrón de bandas que los silvestres; no obstante, una vez que se ha convertido en *petite*, se observa claramente como parte del ADN se pierde y el patrón de restricción cambia.

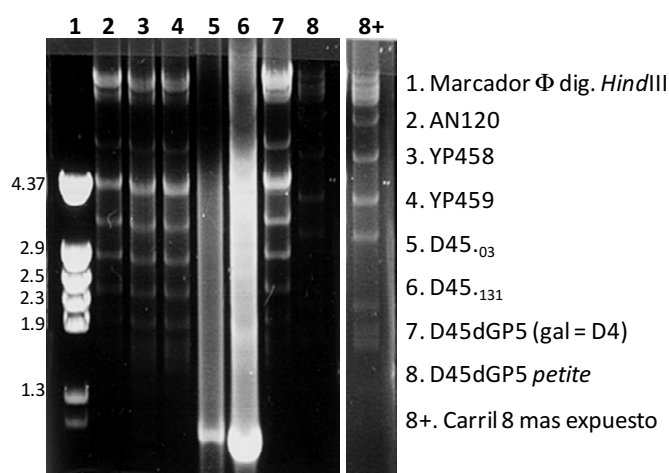


Figura IV.19 Cambios en el ADN mitocondrial en los mutantes D45. 15 µg de ADN mitocondrial de las cepas indicadas en la figura, fueron digeridos con la enzima de *EcoRV* y cargados en un gel de agarosa al 0,5%. La electroforesis se realizó a 20 voltios durante 8 horas, y el ADN fue detectado mediante la tinción con SYBR Safe DNA Gel Stain.

Podemos concluir que el fenotipo *petite* irreversible de los mutantes D45 es a consecuencia de daños en su genoma mitocondrial.

IV.5.3.4 Síntesis de proteínas mitocondriales. Detección de Cox2

Mitocondrias extraídas de un mutante D45 *petite* (D45.₀₃), del parental silvestre (AN120) y un *petite* surgido de manera espontánea de este parental (P.esp_{AN120}) fueron analizadas mediante Western blot para detectar la presencia de las proteínas mitocondriales porina, Sal1 y Cox2. Tanto porina como Sal1 son proteínas mitocondriales codificadas en el genoma nuclear; por el contrario Cox2, está codificada en el genoma mitocondrial. Según se observa en la Figura IV.20.A, las mitocondrias del mutante D45 *petite* no poseen la proteína Cox2, al igual que un *petite* espontáneo, y a diferencia del parental silvestre. No obstante, las otras proteínas mitocondriales Sal1 y porina, sí se encuentran presentes.

Para comprobar que la ausencia de Cox2 es una característica común en todos los mutantes D45 *petite* descritos en este trabajo, se analizaron las mitocondrias de 5 clones obtenidos mediante esporulación y otros 5 clones conseguidos por transformación. En todos los casos (Figura IV.20.B) Cox2 está ausente, a diferencia de porina y Sal1, lo que nos indican que Cox2 no se está expresando. En el caso del mutante condicional (Figura IV.20.C) se observa que hasta las 48 horas creciendo en glucosa todavía las mitocondrias siguen presentando Cox2; no obstante, a las 84 horas esta proteína no se detecta.

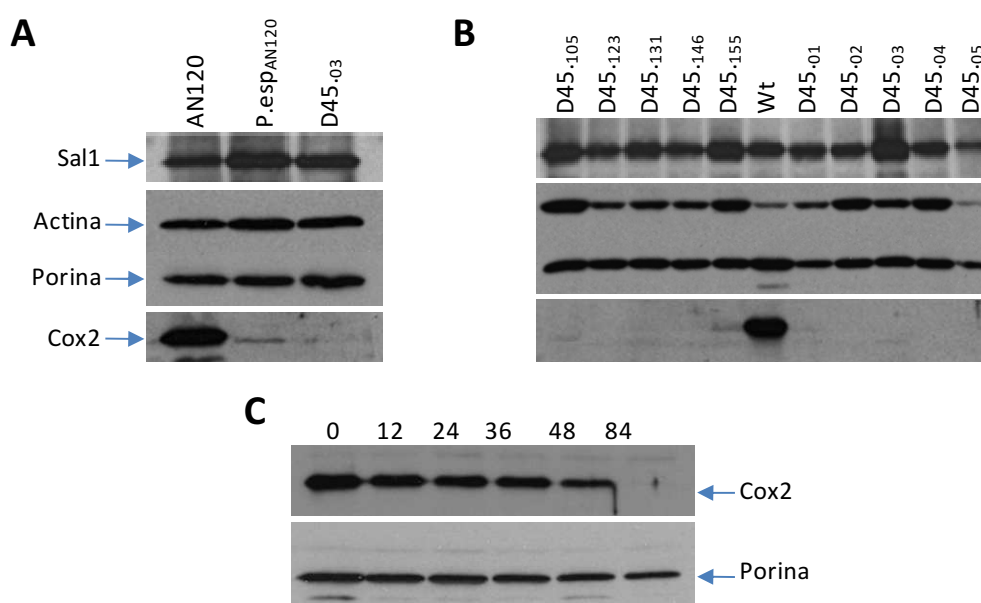


Figura IV.20 Fallo en la traducción mitocondrial en los mutantes D45. Western blot de 20 µg de mitocondrias extraídas de diferentes clones de D45 revelado contra la proteína Cox2 y otras proteínas mitocondriales (porina y Sal1) y actina como control de carga. Se muestran mitocondrias extraídas de: en **A**, células con fenotipo *petite* (*Petite* espontáneo y D45 *petite*) y del silvestre (AN120). En **B**, diferentes mutantes D45 obtenidos mediante esporulación y transformación. En **C**, el mutante condicional D45dGP5 después de 12, 24, 36, 48 y 84 horas creciendo en YEPD; el tiempo 0 corresponde a las células creciendo en galactosa.

La ausencia de Cox2 en las mitocondrias del D45 *petite* puede deberse a que la región del ADN mitocondrial que codifica Cox2 esté ausente o bien a que no estén desarrollándose los procesos de transcripción y/o traducción mitocondrial. Para aclarar este punto, en primer lugar se amplificó el gen *COX2* mediante PCR a partir de ADN total del mutante condicional creciendo durante diferentes tiempos en glucosa (0, 12, 24, 36, 48 y 84 horas). Los resultados (Figura IV.21.A) demostraron que hasta a las 84 horas (tiempo en el cual no se observa la presencia de Cox2), el gen *COX2* es amplificado; lo que demuestra que esta región del ADN no está afectada en los mutantes D45 *petite*.

La ausencia de la proteína Cox2 debía ser a consecuencia de algún defecto en la traducción o transcripción mitocondrial. Para distinguir entre estas posibilidades realizamos marcaje *in vitro* de los productos de traducción mitocondrial en presencia de cicloheximida (que detiene la síntesis de proteínas citoplasmática) y [³⁵S]-met en cultivos del mutante condicional D45dGP5 mantenido durante 24, 48, 72 y 96 horas, en medio con glucosa como fuente de carbono. Los resultados (Figura IV.21.B) mostraron que entre las 24 y 48 horas creciendo en glucosa las mitocondrias del mutante condicional pierden la capacidad para sintetizar proteínas; no obstante, este resultado debe ser atribuido a la ausencia de ARN mensajeros ya que, al menos en el caso de Cox2, mediante ensayos de RT-PCR (Figura IV.21.C) se demostró que el mensajero de *COX2* apenas es detectado en las mitocondrias del mutante inclusive a las 48 horas de incubación en glucosa.

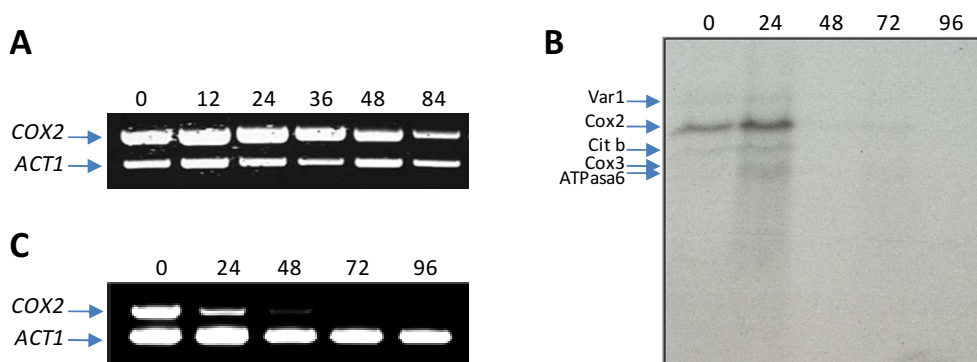


Figura IV.21 Alteración en el flujo de la información genética mitocondrial en ausencia de las proteínas P. En **A**, Amplificación mediante PCR de los genes *COX2* y *ACT1* (como control) a partir de ADN genómico extraído de células del mutante condicional D45dGP5, incubado durante diferentes tiempos en medios con glucosa (12 → 96 horas) ó galactosa (0 horas). En **B**, marcaje con ³⁵S met de los productos de traducción mitocondrial *in vitro* en células del mutante condicional D45dGP5 cultivado en glucosa (durante diferentes tiempos indicados) o galactosa (tiempo 0). En **C**, análisis mediante RT-PCR cualitativa del ARN mensajero de *COX2* y *ACT1* (como control).

IV.5.4 Caracterización de las mitocondrias del mutante D45

IV.5.4.1 Aislamiento de mitocondrias y comprobación de su pureza

Para comprobar el grado de pureza de la fracción mitocondrial aislada, se analizaron mediante Western blot cantidades proporcionales tanto de las mitocondrias purificadas como del extracto total, empleando anticuerpos frente a carboxipeptidasa Y (vacuolas), Vsp10p (golgi), y proteínas del ribosoma L12 y P0 (retículo endoplasmático rugoso). También se empleó un anticuerpo específico contra la porina mitocondrial. Los resultados, presentados en la figura IV.22, muestran cómo la fracción mitocondrial se encuentra enriquecida en mitocondrias, sin apenas detectar componentes contaminantes como vacuolas, golgi y los ribosomas citoplásmicos (Figura IV.22). Si es de destacar la presencia de la proteína ribosómica P0 en las mitocondrias purificadas.

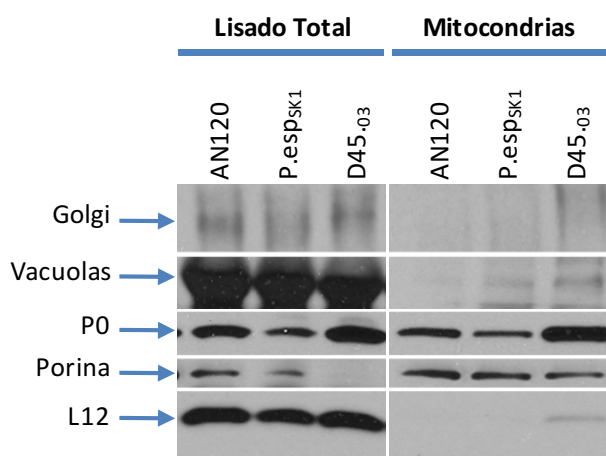


Figura IV.22 Pureza de las mitocondrias. Western blot de 20 µg de mitocondrias y 80 µg de lisado total de las cepas silvestre AN120, un *petite* espontáneo surgido del silvestre AN120 (P.esp_{SK1}) y un D45 *petite* (D45₀₃); revelado con los anticuerpos específicos contra componentes citoplasmáticos: golgi (Vps10p), vacuolas (carboxipeptidasa Y), retículo endoplasmático rugoso (proteínas ribosómicas P0 y L12) y contra porina proteína de la membrana externa mitocondrial.

I.V.5.4.2 Los mutantes D45 acumulan P0 en la mitocondria

Durante la caracterización proteica de las mitocondrias de los mutantes D45 nos llamó la atención que la proteína ribosómica P0 aparecía en las mitocondrias del parental silvestre y además, se detectaba en mayor cantidad en las mitocondrias del mutante D45 (ver Figura IV.22). Lo primero que se descartó es que se tratase de una contaminación de la fracción mitocondrial con retículo endoplásmico rugoso (el cual posee ribosomas asociados) ya que la

cantidad de otra proteína ribosómica, L12, apenas se encontraba presente en la fracción de mitocondrias. Lo siguiente fue comprobar que la cantidad de mitocondrias cargadas fuese la misma en todos los casos; la intensidad de la banda correspondiente a porina excluye la posibilidad que en el D45 existiese mayor cantidad de mitocondrias. Por lo tanto, la presencia de P0 en las mitocondrias parecía ser una característica específica del D45 *petite*.

Por último, nos planteamos si la presencia de P0 en las mitocondrias era una particularidad del fondo genético SK1, para lo que caracterizamos la presencia de P0 en las mitocondrias de las cepas equivalentes obtenidas en el fondo genético W303. Para ello, mitocondrias de células de un silvestre (W303), un *petite* espontáneo (P.esp_{W303}) y un D45 *petite* del fondo genético W303 (D45^p) fueron analizadas mediante Western blot. Según se muestra en la Figura IV.23, el resultado fue similar en ambos fondos genéticos, P0 estaba acumulándose en las mitocondrias de los mutantes D45 *petite*, pero no en los *petite* espontáneos ni en el parental silvestre.

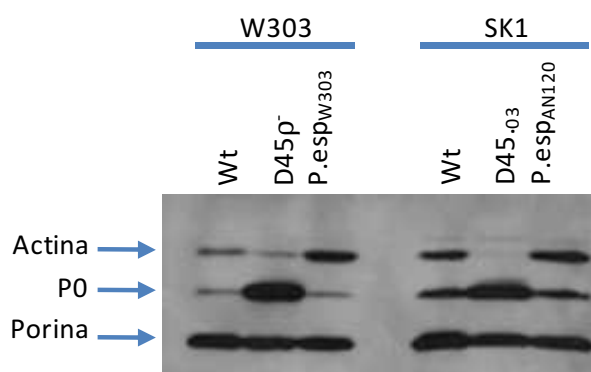


Figura IV.23 Acumulación de P0 en las mitocondrias. 20 μ g de mitocondrias extraídas de las cepas silvestres (Wt), *petite* espontáneos (P.esp) y D45 *petite* (D45₀₃; D45^p); de los fondos genéticos W303 y SK1, separadas en geles de PAGE/SDS al 10% y revelado con los anticuerpos monoclonales anti-actina, anti-porina como controles de carga y anti-P0 (3BH5).

Nos preguntamos entonces si la acumulación de P0 en la mitocondrias era una característica de todos los D45 *petite* obtenidos por los diferentes métodos mencionados durante el desarrollo de este trabajo. En la figura IV.24, se puede observar como en general todos los mutantes D45 estudiados presentan acumulación de P0 en la mitocondria; no obstante, se observan diferencias en la cantidad de P0 acumuladas

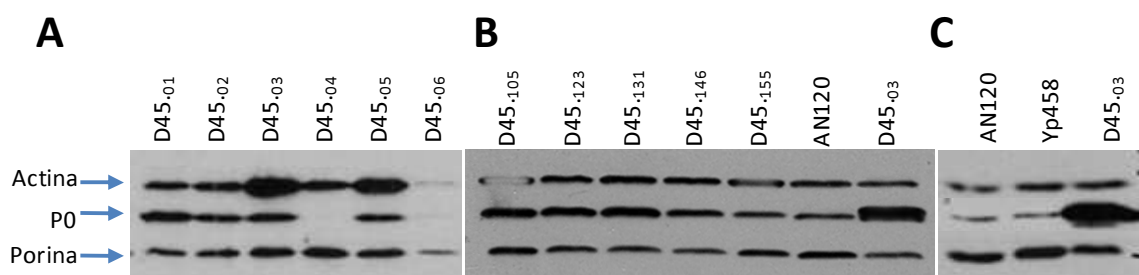


Figura IV.24 Diferencias de P0 en las mitocondrias de los mutantes D45. Western blot de mitocondrias (20 μ g) extraídas diferentes cepas de D45 *petite*, obtenidas mediante esporulación (A) y transformación (B), y de los parentales silvestres diploide (AN120) y haploide α (Yp458) (C); revelado con los anticuerpos anti-actina, anti-porina y anti-P0 (3BH5). En B, el mutante D45₋₀₃, es empleado como control de la cantidad de P0.

IV.5.4.3 La presencia de P0 en las mitocondrias es ocasionada por la ausencia de las proteínas P1/P2.

Para estudiar la relación entre la ausencia de las proteínas P2 en el mutante D45 y la acumulación mitocondrial de P0 decidimos extraer mitocondrias de la cepa D45 *petite* transformada con los plásmidos centroméricos pFL38P2 α ó pFL38P2 β (apartado IV.5.1) y analizar la presencia de P0 en estas mitocondrias. Los resultados mostrados en la figura IV.25, muestran que la reexpresión de las proteínas P2 α y P2 β si bien no revertía el fenotipo *petite*, impide la acumulación de P0 en las mitocondrias. Este resultado sugiere que la acumulación de P0 en las preparaciones de mitocondrias del mutante D45 deriva de su deslocalización al no interaccionar con los heterodímeros P1/P2.

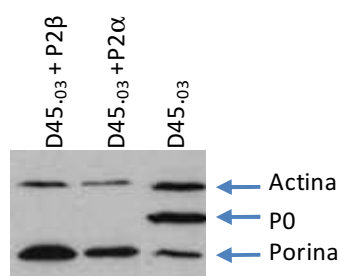


Figura IV.25 La reexpresión de las proteínas P2 impide la acumulación de P0 en las mitocondrias. Western blot de 20 μ g de mitocondrias extraídas a partir de la cepa D45₋₀₃ antes y después de expresar las proteínas P2 (P2 α ó P2 β) mediante plásmidos que contienen los genes *RPP2A* y *RPP2B* (pFL38P2 α y pFL38P2 β), revelado con los anticuerpos monoclonales contra actina, P0 y porina.

IV.5.4.4 La sobreexpresión de P0 la dirige a mitocondrias

Sabemos que P0 puede acumularse en forma de precipitados en otros compartimientos subcelulares como membrana y pared celular en condiciones de sobreexpresión de P0 (J.P.G Ballesta, comunicación personal). En los mutantes D45 la proteína P0 no se encuentra sobreexpresada; no obstante, las proteínas P1/P2 están ausentes y no puede formarse el complejo pentamérico, lo que podría producir un efecto similar a la sobreexpresión de P0, ocasionando que se acumule en mitocondrias. Para comprobar esta hipótesis, se estudiaron diferentes cepas disponibles en el laboratorio donde P0 puede encontrarse en mayor cantidad.

Las cepas utilizadas fueron: dGP0_{W303}, cepa silvestres que expresa P0 bajo el promotor *GAL1*, en el cual se ha descrito que en galactosa presenta aumentada la expresión de P0 en 2-3 veces respecto a su propio promotor [Santos y Ballesta, 1994]. Mutante cuádruple D4567, tiene interrumpidos los genes que codifican las 4 proteínas ácidas [Remacha *et al.*, 1995a]. Mutante P0ΔAB_{W303}, expresa una forma truncada de P0, donde las regiones de interacción de las proteínas P1/P2 están eliminadas y, por lo tanto, las proteínas P están presentes en el citoplasma de la levadura pero no pueden unirse a P0, no detectándose en los ribosomas [Cárdenas, 2008]. Si bien es cierto que estos mutantes están generados en el fondo genético W303, el hecho de que las mitocondrias del D45 *petite* de este fondo genético también presentaron una acumulación de P0 (Figura IV.23), nos animó a seguir con el estudio de estos mutantes. Los resultados mostrados en la figura IV.26 revelan como excepto en la levadura silvestre, las mitocondrias de todos estos mutante presentan una acumulación de P0.

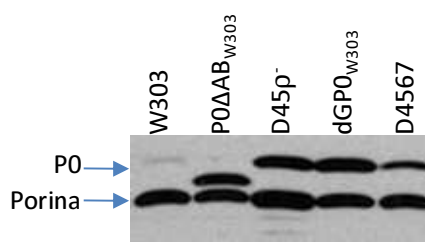


Figura IV.26 Acumulación de P0 en las mitocondrias de diferentes mutantes del tallo. Western blot de mitocondrias (20 µg) extraídas de mutantes del tallo en el fondo W303, revelado con los anticuerpos anti-P0 (3BH5) y anti-Porina como control de carga. Se observa la diferencia de tamaño de P0 en el mutante P0ΔAB con respecto al resto ya que es 60 aminoácidos más pequeña que la forma endógena de P0.

Este resultado de nuevo sugiere que la presencia de P0 en la mitocondria está relacionada con situaciones donde no se puede ensamblar el tallo ribosómico en su forma

pentamérica, porque P0 no está interaccionando con las proteínas P1/P2 (casos D4567, D45 y P0ΔAB) o porque P0 está expresada en mayor cantidad (dGP0).

Al observar estos resultados, nos interesamos en crear algunos de estos mutantes en el fondo genético SK1 y observar si eran reproducibles. Para la obtención del mutante condicional dGP0 se siguió el procedimiento esquematizado en la figura IV.27. Se partió de la cepa silvestre diploide AN120, la cual fue transformada con el módulo de reemplazamiento génico extraído por digestión con enzimas de restricción a partir del plásmido BSKP0 que lo contiene (Figura IV.27.A). Este *cassette* contiene el gen *KanMX4* (que le confiere resistencia a geneticina) seguido del promotor *GAL1* (que sustituye el promotor de P0) y la ORF de P0 (Figura IV.27.A). La inserción en el genoma ocurre mediante recombinación homóloga de las secuencias flanqueantes. De esta manera, la expresión de P0 se encuentra ahora bajo el control del promotor *GAL1*, siendo dependiente de la presencia de galactosa en el medio de cultivo. Después de confirmar mediante PCR la correcta inserción del *cassette* (Figura IV.27.B), el clon heterocigoto diploide seleccionado fue incubado en condiciones de esporulación y se diseccionaron las tétradas en placas con galactosa suplementada con geneticina, condiciones en las cuales sólo los clones haploides dGP0 son capaces de desarrollarse (Figura IV.27B). Por último, para comprobar la expresión condicional de P0, se incubó en medio con glucosa como fuente de carbono condiciones en las cuales no se expresa el gen *GAL1-RPP0*. En estas condiciones este mutante no fue capaz de crecer (datos no mostrados), ya que la proteína P0 es esencial para las células [Santos y Ballesta, 1994].

Para la construcción de la cepa P0ΔAB, se transformó el mutante dGP0 con el plásmido pFL37P0ΔAB, seleccionando en medio con glucosa como fuente de carbono para reprimir la expresión genómica de *GAL1-RPP0*. Para comprobar la correcta expresión de la forma truncada de P0, se realizó un Western blot de extractos totales de las células cultivadas en medio con galactosa (antes y después de transformar) y en medios con glucosa después de transformada (Figura IV.27).

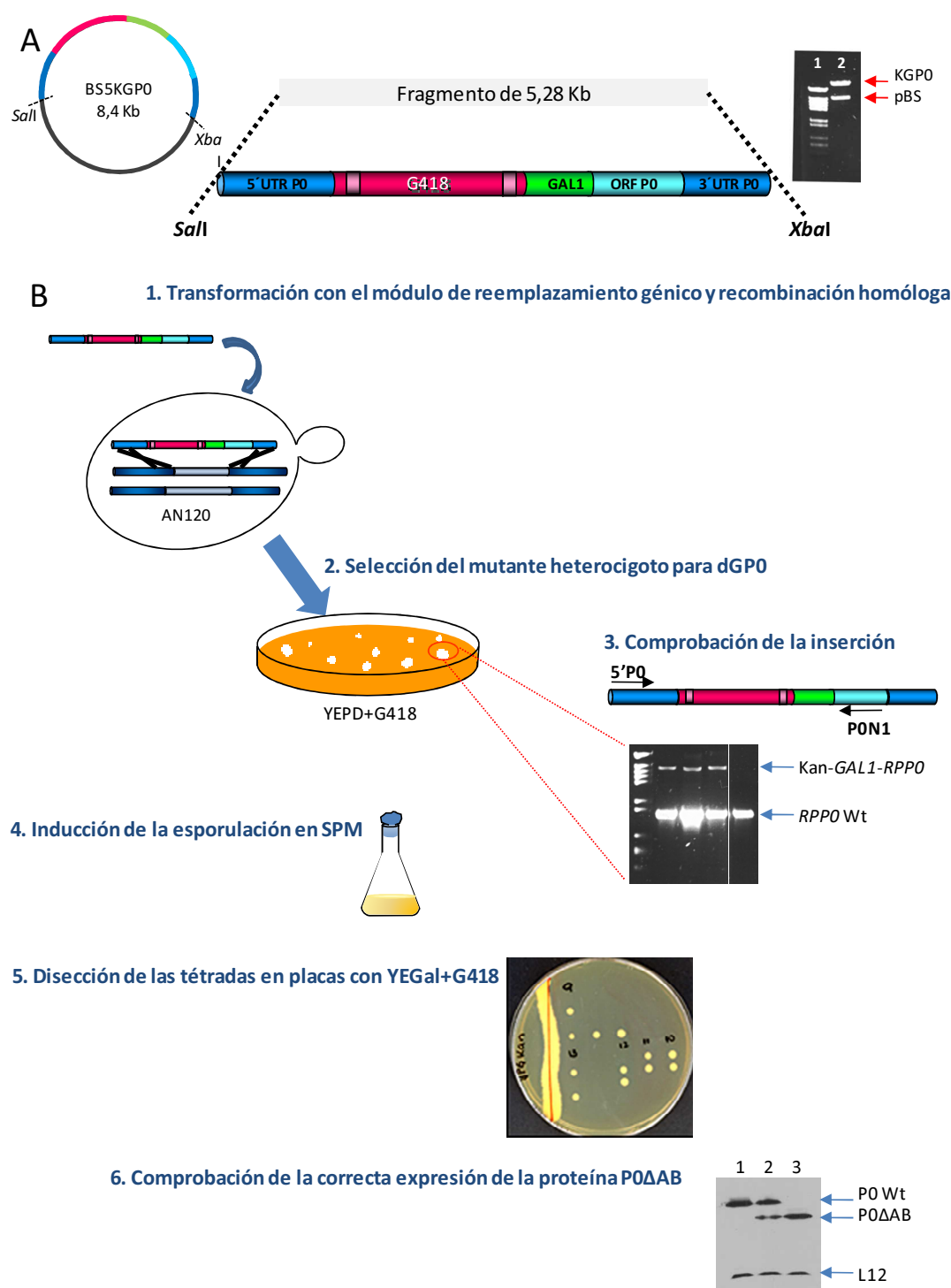


Figura IV.27 Construcción de la cepa dGP0. (A) se muestra la composición del *cassette* de reemplazamiento génico, el cual se encuentra clonado en el plásmido BSKGP0. El módulo de reemplazamiento génico se extrajo mediante digestión con las enzimas de restricción *SalI* y *XbaI*. (B) pasos seguidos en la construcción de la cepa dGP0 (se detallan en el texto). Se especifican los oligonucleótidos empleados en la comprobación de la inserción del *cassette* (tabla III.3). En el apartado 6, se muestra un Western blot donde se detectan las formas silvestre y truncada de la proteína P0. Los números 1, 2 y 3 corresponden a la cepa dGP0 antes (1) y después de transformar con el plásmido pFL37P0ΔAB (2 y 3), cultivada en galactosa (1 y 2) y en glucosa (3). El Western blot fue revelado con el anticuerpo específico contra la proteína P0 (3BH5) y contra la proteína ribosómica L12 usada como control de carga.

Una vez obtenidas las dos cepas de interés, se aislaron mitocondrias y se analizó la presencia de P0 en ellas mediante Western blot. En la figura IV.28 se puede observar que las cepas dGP0 y P0ΔAB presentan el mismo comportamiento que el D45 *petite* (D45.₀₃), acumulándose P0 en las mitocondrias. Este resultado corroboró en el fondo genético SK1 los resultados observados en el fondo genético W303 (Figura IV.26).

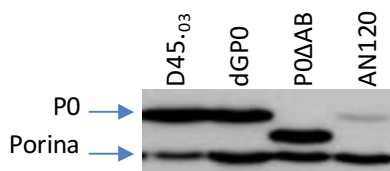


Figura IV.28 P0 en mitocondrias de células del fondo genético SK1 con el tallo desnudo. Western blot de 20 µg de mitocondrias extraídas de los mutantes dGP0, P0ΔAB, un D45 *petite* (D45.₀₃) y el parental silvestre (AN120) del fondo genético SK1; revelado con los anticuerpos anti-P0 (3BH5) y anti-porina.

IV.5.4.5 Compartimentalización de P0 en las mitocondrias

a). P0 copurifica con la membrana mitocondrial interna

Para saber si P0 se encuentra dentro de la mitocondria y descartar que este asociada inespecíficamente a las partículas mitocondriales por su parte externa, se realizaron tratamientos con carbonato de sodio y proteinasa K. Por un lado, el tratamiento con proteinasa K, a la concentración de 0,5 µg/ml, sólo degradaría las proteínas periféricas de membrana pero no las integrales; por otro lado, el carbonato de sodio no es capaz de solubilizar las proteínas integrales de membrana, por lo que las proteínas periféricas aparecerían en el sobrenadante [Roberts *et al.*, 1989; Soriano *et al.*, 1997]. Como se muestra en la Figura IV.29.A y B, ambos tratamientos revelaron que P0 se comporta igual que Sal1 (proteína de membrana interna mitocondrial), y porina (proteína integral de membrana externa) y muy diferente a actina (proteína que interacciona con el exterior de la mitocondria).

Si bien los resultados nos indicaron que P0 es una proteína intramitocondrial, lo quisimos confirmar mediante tratamiento de estas mitocondrias con diferentes cantidades de proteinasa K (de 2,5 a 160 µg/ml). Los resultados (Figura IV.29.C) mostraron una escalera de degradación diferente para cada una de las proteínas, analizadas mediante Western blot. Puede observarse que la proteína en desaparecer a concentraciones mas bajas es actina. La siguiente proteína mas sensible a la degradación es porina, le sigue P0 y Sal1 que son

degradadas casi a la misma concentración. Estos resultados nos confirman que P0 es intramitocondrial, pudiendo encontrarse en el espacio inter membrana (EIM) o asociada a la membrana interna. Para desvelar la localización intramitocondrial de P0, decidimos realizar fraccionamiento de las mitocondrias.

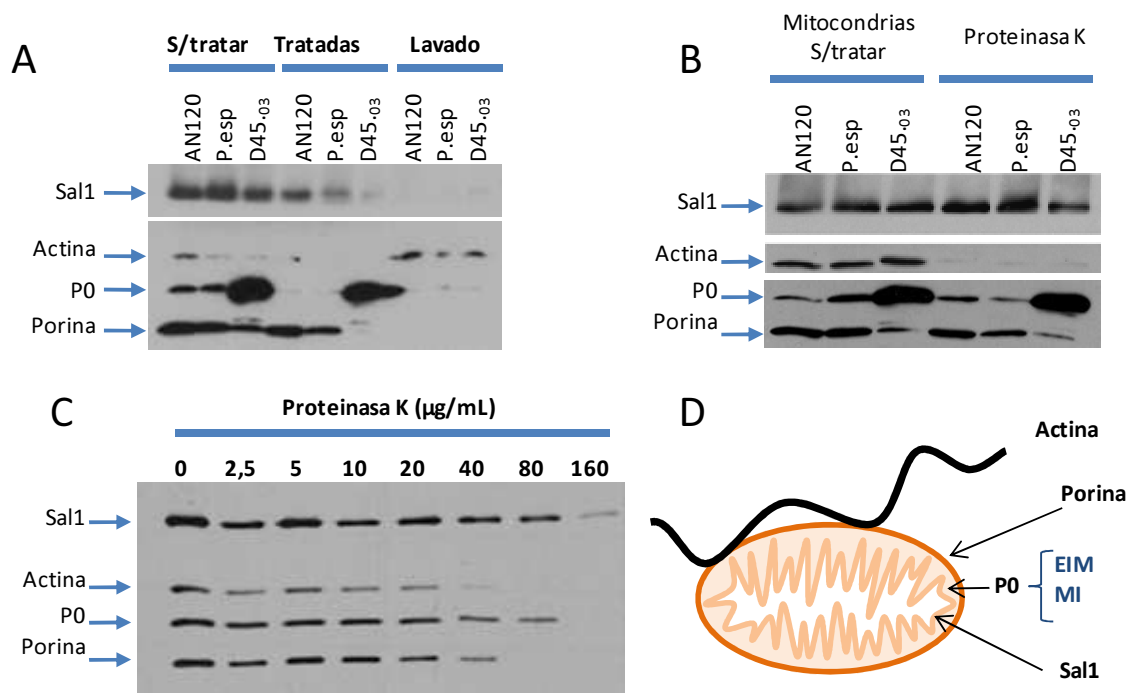


Figura IV.29 Localización submitocondrial de P0. Western blot de 20 µg de mitocondrias extraídas a partir de un parental silvestre (AN120), un *petite* silvestre espontáneo (p.esp) y un D45 *petite* (D45₋₀₃). (A) mitocondrias antes del tratamiento (sin tratar), después del tratamiento con carbonato de sodio (0,1 M pH 11,5) y los productos del lavado. (B) mitocondrias intactas y después de digeridas con 0,5 µg de proteínasa K. (C) mitocondrias extraídas del mutante D45 *petite* (D45₋₀₃) digeridas con las concentraciones de proteínasa K indicadas. Los Western blot fueron revelados con los anticuerpos anti-Sal1, anti-actina, anti-P0 (3BH5) y anti-porina. La ubicación de cada una de las proteínas detectada en los Western blot se encuentra esquematizada en D.

b). Fraccionamiento mitocondrial

A partir de mitocondrias purificadas de una cepa silvestre y un D45 *petite* (D45₋₀₃) aislamos membrana externa, membrana interna, espacio inter-membrana y matriz siguiendo el protocolo esquematizado en la Figura IV.30.A.

Los resultados de la Figura IV.30.B, muestran que en ambas cepas P0 parece estar unida específicamente a la membrana interna mitocondrial (MI), ya que ésta es la fracción que está selectivamente enriquecida con P0. Como controles del fraccionamiento utilizamos los anticuerpos contra las proteínas porina, que aparece específicamente en la fracción de

membrana externa y Sal1, que aparece en ambas fracciones de membrana, posiblemente por contaminación de la fracción de membrana externa con pequeños trozos de membrana interna.

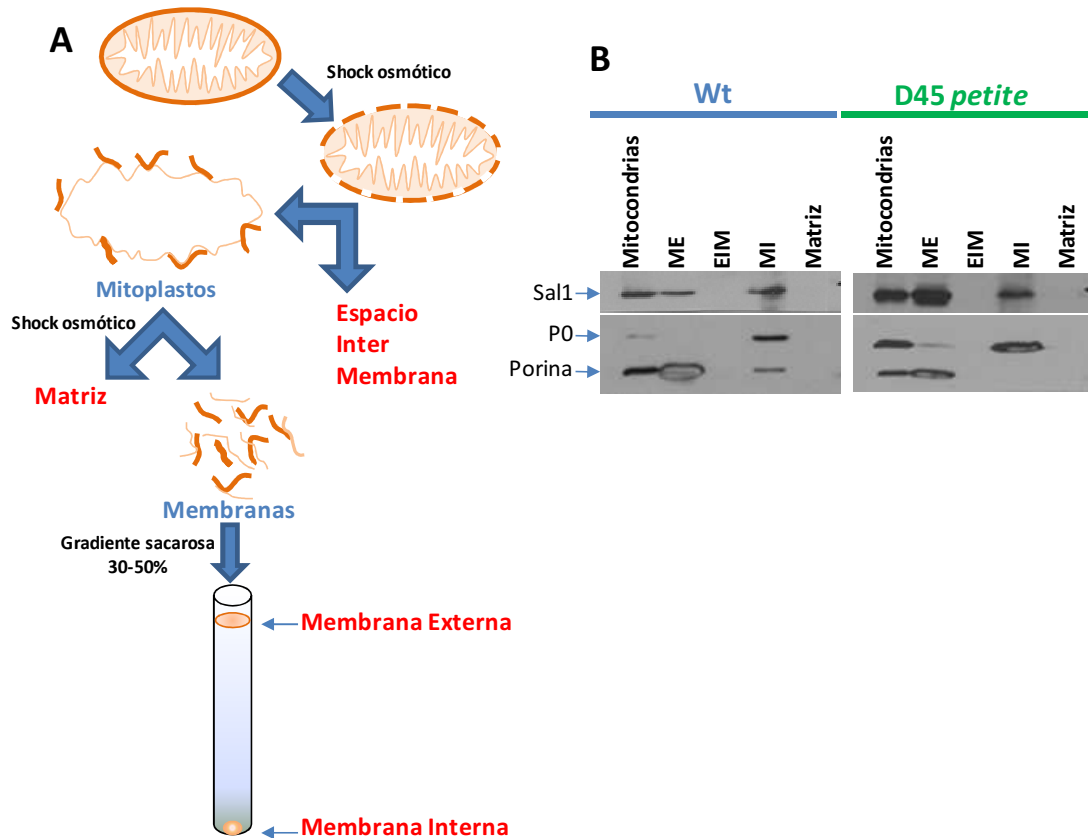


Figura IV.30 Fraccionamiento mitocondrial. (A) procedimiento experimental seguido para el fraccionamiento de las mitocondrias detallado en el apartado III.11.2. (B) Western blot de las distintas fracciones mitocondriales obtenidas; membrana externa (ME), espacio inter-membranas (EIM), membrana interna (MI) y matriz. De cada fracción se cargaron cantidades equivalentes. Se procesaron mitocondrias de un silvestre parental silvestre (Wt) y un D45 *petite* (D45.₀₃).

c). Relación de P0 con los ribosomas mitocondriales

La localización intramitocondrial de P0 es sorprendente, ya que esta proteína no posee una señal evidente de transporte a mitocondria. En cualquier caso, el hecho de que los ribosomas mitocondriales (72S) de *S. cerevisiae* se localizan en la membrana interna mitocondrial [Ott *et al.*, 2006], junto con las evidencias observadas en el laboratorio que indican que P0 es capaz de interaccionar con el sitio GTPasa de los ribosomas de *E. coli* (datos no publicados), nos hizo plantear la hipótesis de que tal vez P0 esté interaccionando con los ribosomas mitocondriales.

Para este análisis se partió de mitocondrias purificadas a partir de células silvestre, del D45 *petite* y también se incluyó el D45 *petite* transformado con la proteína P2 α , a fin de observar si la unión de P0 a los ribosomas de mitocondria se revertía al expresar una de las proteínas P2.

Para el aislamiento de los ribosomas mitocondriales es necesario tratar las mitocondrias purificadas con digitonina (2%), que actúa como un detergente que solubiliza los lípidos de las membranas mitocondriales, liberando las proteínas de la membrana, además de los ribosomas que están unidos a la membrana interna mitocondrial. Para observar el rendimiento obtenido durante el aislamiento de los ribosomas, se analizaron mediante Western blot cantidades equivalentes de las mitocondrias purificadas, el sedimento y el sobrenadante producto del tratamiento con digitonina. Los resultados (figura IV.31) mostraron que tanto la proteína mitocondrial porina, como actina y los ribosomas mitocondriales son liberados de las membranas y aparecen en el sobrenadante. Por el contrario P0 aparece en el sedimento. El hecho que la proteína P0 siga apareciendo en la fracción de membranas después de tratar con digitonina, mientras que los ribosomas son liberados al sobrenadante, nos hizo descartar la hipótesis de que P0 pudiera estar asociada a los ribosomas mitocondriales.

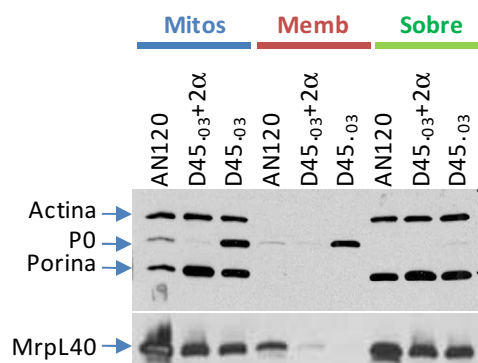


Figura IV.31 Purificación de ribosomas mitocondriales. Western blot de 20 μ g de mitocondrias intactas (Mitos), membranas mitocondriales (Memb) y sobrenadante (Sobre) productos de la digestión con digitonina al 2%. Se reveló con el anticuerpo anti-P0 (3BH5), anti-MrpL40 (proteína ribosómica mitocondrial L40), anti-actina y anti-porina.

d). P0 se localiza en complejos proteicos

Hasta ahora sabemos que P0 se encuentra intramitocondrial y que aparentemente está asociada a las fracciones de membrana (ya que copurifica con ellas). Por otro lado,

sabemos que P0 es una proteína con un dominio de unión a ARN, que interacciona con las proteínas P, y además se le ha descrito una actividad endonucleasa en *D. melanogaster* [Yacoub *et al.*, 1996]. Para determinar la naturaleza estructural de los componentes de la mitocondria a los que se asocia P0, decidimos ensayar su sensibilidad a nucleasas (DNAsa y RNAsa) y a urea (compuesto capaz de disolver complejos proteicos). Estos tratamientos se realizaron tanto en mitocondrias intactas como en las membranas mitocondriales producto de la solubilización de las mitocondrias con digitonina al 2%. Los resultados (figura IV.32) mostraron que las nucleasas no fueron capaces de solubilizar P0 ni en las mitocondrias intactas ni en la fracción de membranas (no aparece en el sobrenadante), resultado que parece descartar la posibilidad que P0 se encuentre unida a ADN o ARN mitocondrial. Por el contrario el tratamiento con urea sí fue capaz de solubilizar (parcialmente) P0, apareciendo en el sobrenadante tanto de las mitocondrias intactas como de las membranas mitocondriales.

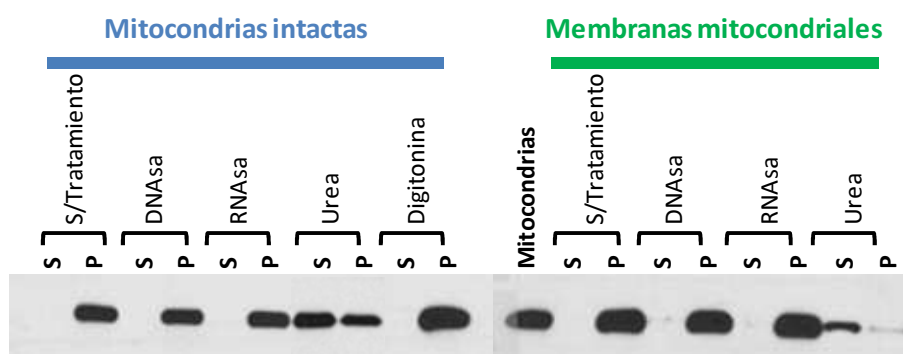


Figura IV.32 Complejos de P0 dentro de la mitocondria. Tanto las mitocondrias purificadas a partir del mutante D45.₀₃ así como las membranas mitocondriales correspondientes al sedimento producto de la centrifugación a 18000 xg después de la digestión con digitonina (2%), fueron tratadas con DNAsa (0,12 U/ μ l), RNAsa DNAsa free (50 μ g/ml), urea (7,5 M) y digitonina (2%). Se cargó en cada uno de los casos 20 μ g de proteína. Los Western blot fueron revelados con el anticuerpo 3BH5 (anti-P0).

Este resultado nos está indicando que P0 se encuentra formando complejos con proteínas, asociados a membranas.

IV.5.5 Búsqueda de genes relacionados con la alta tasa de D45 *petite* en SK1

En el laboratorio existe una colección de mutantes para las proteínas ácidas creada en varios fondos genéticos, la mayoría de ellos en el fondo W303. A diferencia de lo descrito en esta memoria para el fondo genético SK1, en los mutantes D45 de W303, aunque la tasa de

conversión en *petite* es muy superior a la observada tanto en el parental silvestre como en otros mutantes que tienen proteínas ácidas asociadas al ribosoma, es posible obtener un D45 *grande* capaz de crecer bajo metabolismo estrictamente respiratorio. Basándonos en estos resultados nos preguntamos si el fondo genético SK1 carece de algún componente genético que, combinado con la ausencia de las proteínas P2, potencia su conversión en *petite*. Para aclarar este punto, decidimos construir un D45 híbrido SK1/W303 y determinar su competencia respiratoria y así establecer qué fondo genético aportaba el carácter dominante.

El híbrido SK1/W303 fue creado conjugando los haploides D45 *grande* del fondo W303 (D45_{W303}) y el haploide condicional D45dGP5 del fondo SK1. Tanto durante el crecimiento individual de los haploides de partida, como durante la conjugación y posterior selección del diploide, los cultivos se mantuvieron siempre en medio con galactosa, para garantizar su competencia respiratoria [Spencer *et al.*, 1983; Donnini *et al.*, 1992]. Al caracterizar el híbrido D45 SK1/W303 observamos que éste era capaz de crecer bajo condiciones respiratorias (medio con glicerol-etanol), a diferencia del diploide formado entre el D45dGP5 y el D45 *petite* (D45₀₃), ambos del fondo genético SK1 (Figura IV.33). Esto parece indicar que el fondo genético W303 posee algún carácter dominante que al conjugarlo con SK1, le permite al mutante 45 híbrido desarrollarse bajo un metabolismo estrictamente respiratorio.

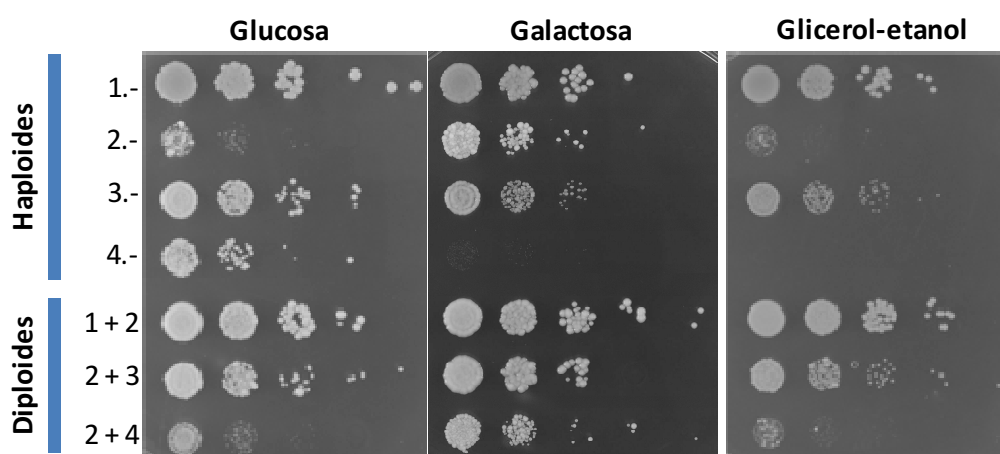


Figura IV.33 Genotipo dominante del mutante D45 del fondo genético W303. Se observa el crecimiento en placas con medio YEPD, YEPGal e YEPGE de los Haploides: 1.- Silvestre de W303; 2.- D45dGP5 (mutante condicional) fondo genético SK1; 3.- D45 *grande* del fondo genético W303 (D45_{W303}) y 4.- D45 *petite* (D45₀₃) fondo genético SK1. Diploides híbridos entre el fondo genético W303 y SK1: 1 + 2 = Wt (W303) + D45dGP5; 2 + 3 = D45dGP5 + D45_{W303}; 2 + 4 = D45dGP5 + D45 *petite*.

Tratando de identificar el gen o los genes de W303 que impiden el daño de las mitocondrias en los mutantes carentes de proteínas ácidas en este fondo genético, transformamos el mutante condicional (D45dGP5) con una genoteca preparada a partir de ADN genómico de W303 (ver tabla III.2). Los transformantes se seleccionaron en placas con medio sintético completo con glicerol-etanol como fuente de carbono.

Puesto que la genoteca contiene los genes de las proteínas P, se prepararon extractos totales de los transformantes obtenidos, que se chequearon por Western blot a fin de descartar que estas fuesen las responsables de su crecimiento en las condiciones de *screening*.

Tras múltiples repeticiones de este ensayo (23 en total), se logró chequear varias veces el genoma de la levadura, obteniéndose un total de 63 transformantes capaces de crecer en medios con glicerol-etanol, de los cuales 61 expresaban una de las proteínas P2, por lo que no son D45. Tan solo 2 transformantes con competencia respiratoria no habían sido complementados por estos genes. A partir de estos 2 clones se extrajo el plásmido, se amplificó el inserto contenido y se identificó el gen que contenía mediante secuenciación. En un caso el gen aislado fue *ESC1*, que codifica una proteína localizada en la periferia nuclear implicada en el silenciamiento de los telómeros. En el otro caso identificamos el gen *FLP1* que codifica una recombinasa del plásmido de 2 μ (2 micras) requerida para la propagación del plásmido. En cualquier caso, la retransformación del mutante condicional D45dGP5 con estos plásmidos no impedía que las células se convirtieran en *petite*, por lo que concluimos que los transformantes seleccionados procedían de células *grande* que se seleccionaron espontáneamente durante la transformación.

IV.6 OBTENCIÓN DEL MUTANTE D67 COMPETENTE EN RESPIRACIÓN.

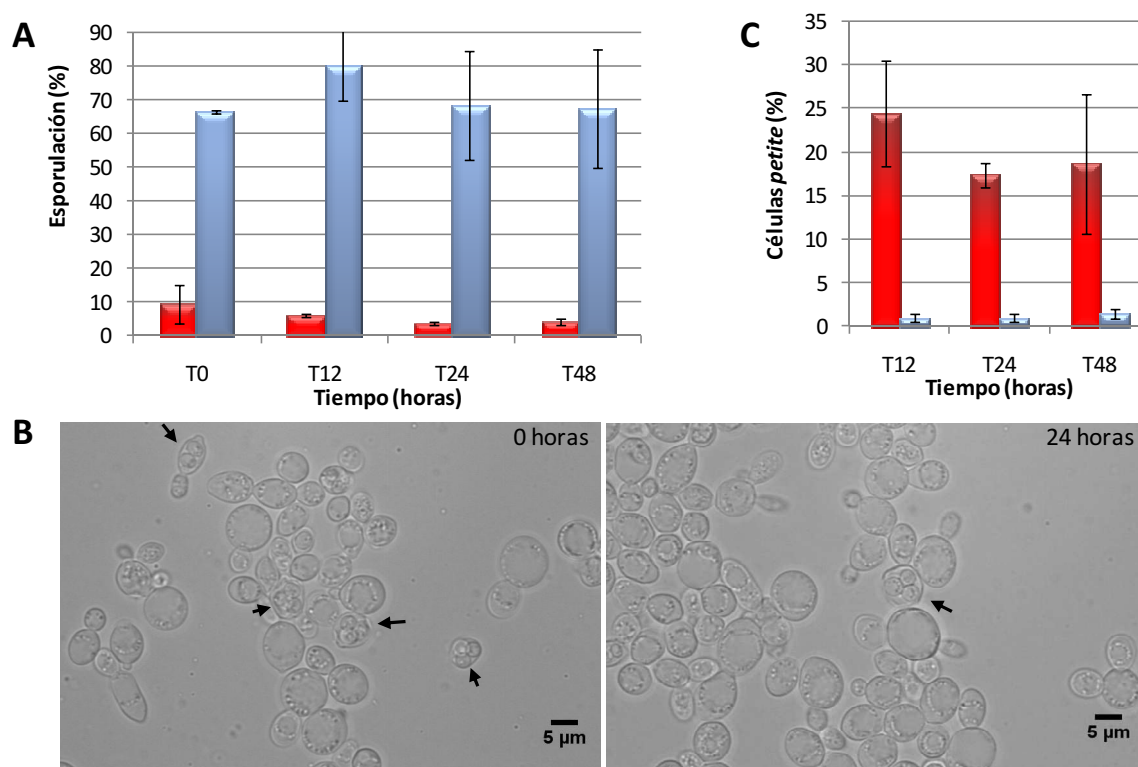
En el caso de los mutantes D67 disponíamos de dos haploides con actividad mitocondrial, ambos del tipo sexual α (apartado IV.3). Para obtener mutantes D67 del tipo sexual *a* competentes en respiración se diseccionaron nuevas tétradas a partir del cultivo d6d7 (diploide heterocigoto) directamente en placas con medio YEPGE y se seleccionaron los dobles mutantes. Por cruzamiento entre un clon *a* con uno α se obtuvo un diploide DD67 *grande* con competencia respiratoria que podía ser usado en el estudio de la esporulación.

IV.7 ANÁLISIS DE LA ESPORULACIÓN EN LOS MUTANTES SIN PROTEÍNAS P ASOCIADAS AL RIBOSOMA.

La construcción de las cepas DD45dGP5 y DD67 nos permitió retomar el objetivo original de este trabajo; la relación entre el tallo y la esporulación.

IV.7.1 La esporulación en ausencia de las proteínas P1

En el caso del mutante DD67, puesto que pudimos obtener clones con mitocondrias funcionales (apartado IV.6), los diploides se mantuvieron en todo momento en medio con glicerol y etanol como fuentes de carbono para asegurarnos que fuesen competentes en respiración. Por tanto, a partir de células del diploide DD67 y del parental silvestre (AN120) cultivadas en glicerol-etanol, directamente se indujo la esporulación por inoculación en medio SPM (T0); además, también se incubaron estas células en medios con glucosa (YEPD) a partir de los cuales también se indujo la esporulación al cabo de 12, 24 y 48 horas. En cada tiempo se calculó el porcentaje de células *petite* presentes (Figura IV.34).



IV.34 Esporulación del mutante DD67. (A) porcentaje de células esporuladas de un cultivo Wt (azul) ó DD67 (Rojo), transferidas a medio SPM desde glicerol-etanol (T0) después de incubadas en medios con glucosa durante 12 (T12), 24 (T24) y 48 (T48) horas. (B) fotografías en campo claro del diploide DD67 incubado en condiciones de esporulación después de 24 horas creciendo en glucosa y directamente desde glicerol-etanol (0 horas), las flechas muestran las tétradas observadas. (C) porcentaje de células *petite* presentes en los cultivos mantenidos durante 12, 24 y 48 horas en glucosa. Los datos son el resultado de 3 ensayos independientes.

Los resultados obtenidos (Figura IV.34) muestran que si bien es cierto que el mutante DD67 es capaz de esporular, la eficiencia de esporulación solo alcanza el 10% en condiciones de metabolismo estrictamente respiratorio y del 3-4% de las células en condiciones fermentativas, mientras que el parental silvestre mantiene una tasa de esporulación entre 70 – 80% en todas las condiciones (Figura IV. 34.A). Esta baja eficiencia de esporulación en el mutante DD67 no es atribuible a que el cultivo estuviese formado mayoritariamente por células con fallo en la actividad respiratoria, ya que la tasa de células *petite* solo alcanza un 25% (Figura IV.34.C).

I.V.7.2 La esporulación en ausencia de las proteínas P2.

Con el mutante DD45 seguíamos con el inconveniente de no poder trabajar con un mutante con competencia respiratoria. No obstante, disponíamos del diploide formado entre el mutante condicional D45dGP5 y un haploide D45 *petite* (DD45dGP5), ambos del fondo genético SK1 (ver figura IV.33). Si bien es cierto que el fenotipo final de este diploide es la conversión en *petite* tras su cultivo prolongado en glucosa, las mitocondrias aportadas por el D45dGP5 hacen que el diploide posea competencia respiratoria, de manera que es capaz de desarrollarse en medios que contienen galactosa como fuente de carbono. Como el haploide D45dGP5 está aportando el plásmido (pBG45/70) que expresa la proteína P2 β bajo el promotor de *GAL1*, este diploide se comporta como un mutante simple (D4) siempre que esté creciendo en galactosa y una vez que es transferido a glucosa se convierte gradualmente en el doble mutante D45 (apartado IV.5.1).

En estas condiciones se hizo el seguimiento de la esporulación durante la transición de D4 en D45. Basándonos en los datos obtenidos con el haploide D45dGP5, sabemos que el mutante condicional ya puede ser considerado un doble mutante a partir de las 36 horas creciendo en glucosa (aproximadamente 9 generaciones); no obstante, la competencia respiratoria no la pierde totalmente hasta después de 84 horas de incubación en glucosa. Asumiendo que el DD45dGP5 presentaría el mismo comportamiento, se analizó la eficiencia de esporulación en el período de tiempo comprendido entre las 36 y las 48 horas, donde el cultivo puede ser considerado un D45 pero todavía no se ha perdido la capacidad para respirar, y así estudiar el efecto de la ausencia de las proteínas P2 en la esporulación.

El seguimiento de la esporulación de este mutante diploide condicional DD45dGP5 se hizo desde el tiempo 0 horas (cultivo en galactosa) hasta el tiempo 60 horas en glucosa.

Durante el transcurso del ensayo se calculó el porcentaje de células *petite*, el porcentaje de esporulación y se detectó la proteína P2 β en extracto total (S30) en citosol (S100) y unida a los ribosomas (80S).

Los resultados (Figura IV.35) mostraron que tal como había sido observado en el haploide condicional, en el diploide DD45dGP5 al cabo de 36 horas de incubación en glucosa ya no es posible detectar la proteína P2 β por Western blot (Figura IV.35.A); por lo tanto en este momento el cultivo puede ser considerado como un auténtico DD45 diploide. El análisis de esporulación mostró que a medida que las células pierden la proteína P2 β remanente van disminuyendo su capacidad para esporular (Figura IV.35.B). Siempre que la proteína P2 β pudo ser detectada por Western blot, en las células se desarrolla el proceso de esporulación aunque a tasas muy bajas, ya a partir de las 36 horas no se detectan tétradas en las preparaciones observadas al microscopio (Figura 35.D). Puesto que el porcentaje de células *petite* en este momento (36 horas) es del 56% (Figura IV.35.C), la competencia respiratoria debería permitir la esporulación del 44% de las células restantes; no obstante, éstas tampoco esporulan, posiblemente por la ausencia de las proteínas P2.

IV.7.3 Proteínas ácidas libres o asociadas al tallo y su relación con la esporulación.

Se completó el estudio de la esporulación en mutantes que no poseen proteínas ácidas asociadas al ribosoma determinando si el efecto observado en la esporulación es debido a la ausencia de las proteínas asociadas al tallo o a las libres en el citoplasma. Para ello, cuantificamos la esporulación del mutante P0 Δ AB descrito anteriormente (apartado IV.5.4.3), que posee las proteínas ácidas libres en el citoplasma pero éstas no pueden unirse al ribosoma porque P0 posee una delección en la zona de interacción [Cárdenas, 2008].

Como control del ensayo transformamos la cepa dGP0_{SK1} con un plásmido que expresa la proteína P0Wt y observamos la tasa de esporulación de ambos cultivos. Los resultados reflejaron que el mutante P0 Δ AB es capaz de esporular con una eficiencia de esporulación similar al control, alrededor de un 50% (Figura IV.36). Estos resultados sugieren que el proceso de esporulación puede desarrollarse en condiciones donde las proteínas P están presentes en la célula, aunque no puedan unirse a P0 y, por tanto a los 80S.

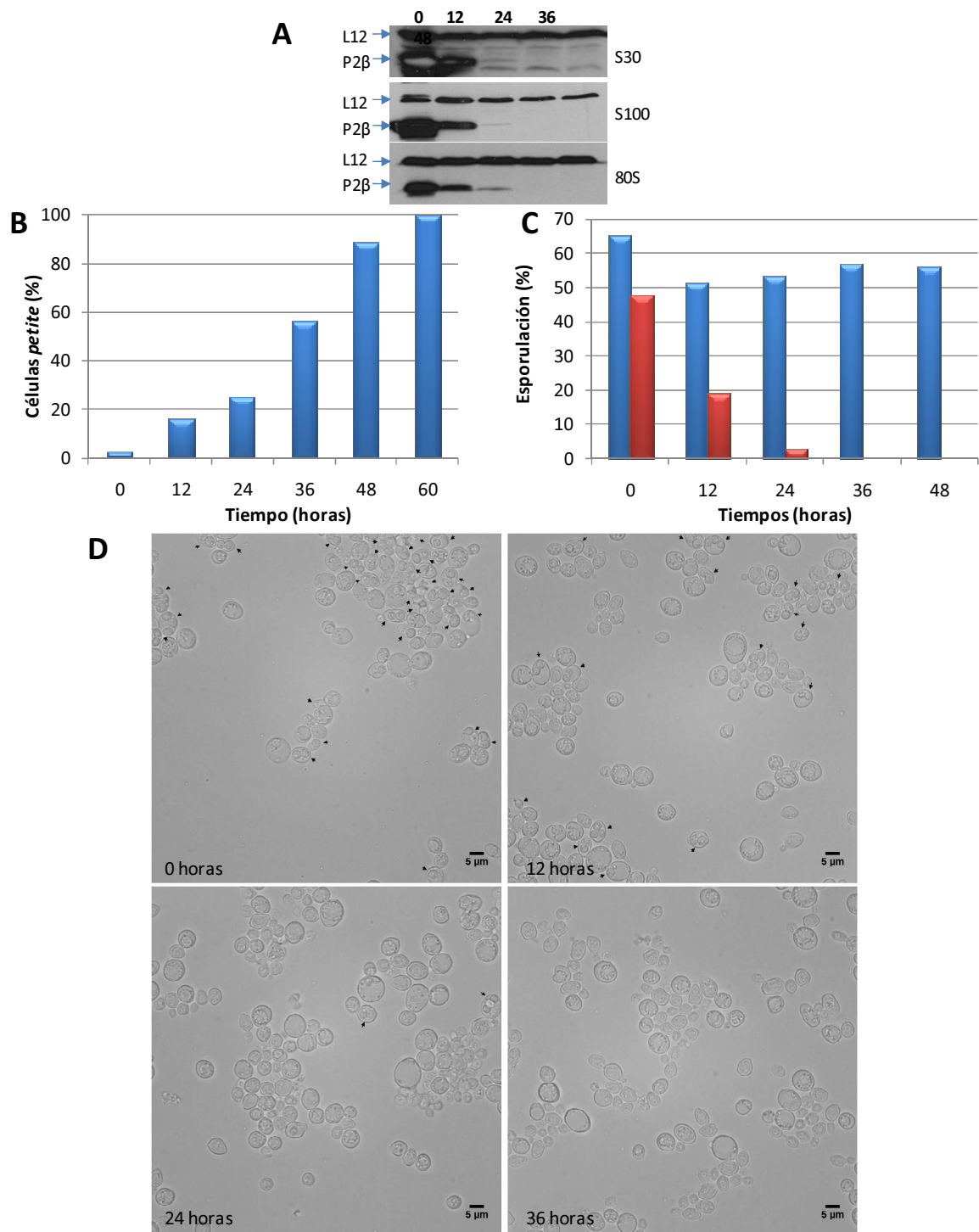


Figura IV.35 Esporulaci3n en mutantes DD45. Mutante condicional D45dGP5 cultivado en galactosa (Tiempo 0) y en glucosa durante 12, 24, 36, 48 y 60 horas. Cada 12 horas se registr3 la disminuci3n de la prote3na P2 β (A), la tasa de conversi3n en *petite* (B) y la tasa de esporulaci3n (C y D). La detecci3n de la prote3na P2 β mediante Western blot (A) se realiz3 a partir del extracto total (S30), de la fracci3n de prote3nas citoplasm3tica libre de ribosomas (S100) y de los ribosomas (80S), aplicando anticuerpos monoclonales contra la prote3na P2 β (1AA9) y la prote3na ribos3mica L12 (1AD7) usada como control de carga. (B), se muestra la tasa de conversi3n en *petite* expresada en porcentaje (%) incluyendo adem3s el tiempo 60 horas. (C) La tasa de esporulaci3n del mutante condicional (en rojo) y de un diploide D4 (en azul) usado como control, (D) im3genes en campo claro del mutante DD45dGP5 esporulando en SPM durante 5 d3as despu3s de 0-36 horas incubadas en medio con glucosa. Las flechas se3alan las t3tradas observadas.

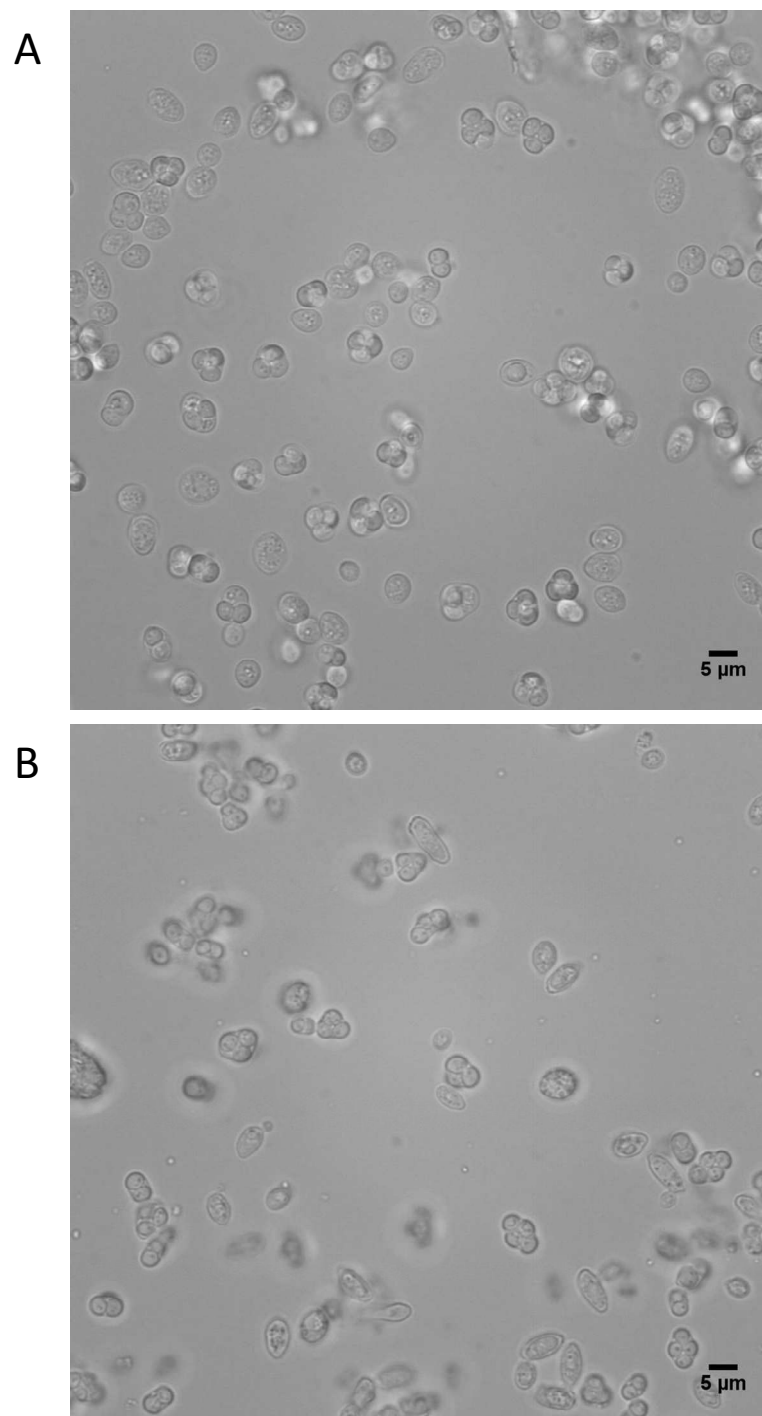


Figura IV.36 Esporulaci3n en presencia de prote3nas P citoplasm3ticas, no unidas a los 80S. Se muestran fotograf3as en microscop3a de campo claro de c3lulas del mutante diploide P0ΔAB (B) y del control P0Wt (A), incubadas en medio de esporulaci3n durante 4 d3as.

V. *Discusión*

La incapacidad para esporular en los mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que no contienen proteínas P asociadas al tallo ribosómico (D45 y D67) había sido descrita por Remacha y colaboradores en 1995 [Remacha *et al.*, 1995a]. En estos mutantes, la ausencia de proteínas ácidas asociadas al ribosoma afecta el patrón de expresión de proteínas, de manera que la traducción de algunas proteínas presentes en la cepa silvestre está drásticamente disminuida, al tiempo que otras se encuentran en más cantidad [Remacha *et al.*, 1995a]. Esta expresión de proteínas diferenciada podría explicar por qué estos mutantes (D45 y D67) no esporulan, si no se traduce alguna proteína implicada en este proceso. No obstante, esas observaciones se realizaron en el fondo genético W303, el cual presenta un inconveniente a la hora de estudiar la esporulación ya que solo un 10-20% de las células desarrolla este proceso, en condiciones óptimas [Ben-Ari *et al.*, 2006]. Para poder realizar estudios moleculares que relacionen el tallo ribosómico y la esporulación era esencial trabajar en condiciones de una eficiencia de esporulación próxima al 100%. Esta fue la razón principal por la que se construyeron los mutantes D45 y D67 en el fondo genético SK1 de *S. cerevisiae*, que posee una alta eficiencia de esporulación ($92 \pm 5\%$ [Ben-Ari *et al.*, 2006]).

Los primeros resultados obtenidos con los mutantes D45 y D67 presentados en esta memoria claramente confirmaban los resultados anteriores, de manera que en ausencia de las proteínas P1 y P2 la esporulación no tenía lugar. Para que se desarrolle el proceso de esporulación es necesario que se cumplan tres requisitos indispensables: que las células sean diploides [Neigeborn y Mitchell, 1991], que se encuentren en condiciones restrictivas de nutrientes (bajo nitrógeno y una fuente de carbono gluconeogénica) [Esposito *et al.*, 1969] y que posean actividad respiratoria mitocondrial [Jambhekar y Amon, 2008].

El hallazgo de que estos mutantes del tallo ribosómico (D45 y D67) no eran capaces de desarrollarse en medios con fuente de carbono no fermentables, y por tanto carecían de función mitocondrial (fenotipo llamado *petite*), nos hizo replantearnos los resultados obtenidos, así como la estrategia a seguir para continuar con el estudio de la esporulación en ausencia de las proteínas P. Simultáneamente, nos abría la posibilidad de estudiar la relación entre las proteínas P y la respiración.

V.1 LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA MITOCONDRIAL REQUIERE DE LAS PROTEÍNAS P

Los resultados obtenidos en este trabajo señalan que las proteínas P son esenciales para el mantenimiento de la función respiratoria mitocondrial. A esta conclusión hemos llegado después de observar que el fenotipo final del mutante D45 siempre resultaba ser *petite*, a pesar de las diferentes estrategias empleadas para su obtención. Cuando se trató de obtener un mutante D45 *grande* mediante esporulación/germinación a partir de un mutante heterocigoto diploide (d4d5), todas las esporas D45 que germinaron en presencia de glucosa resultaron ser *petite*, y en caso de hacer la germinación en un medio con glicerol-etanol ninguna espora dio origen a colonia. Resultados similares fueron obtenidos cuando se trató de obtener el mutante D45 por transformación: cuando se hizo la selección de los transformantes en un medio con glucosa todos los clones resultantes fueron *petite*, y en caso de hacerla directamente en medios con glicerol-etanol, no se obtuvo ningún transformante. Estos datos parecen indicar que una vez que el mutante D45 agota las proteínas P disponibles de la célula, pierde la capacidad de desarrollarse con un metabolismo estrictamente respiratorio. Esta hipótesis pudimos finalmente comprobarla al observar que el mutante condicional D45dGP5 *grande* a medida que se divide (y la proteína P2 β desaparece, convirtiéndose en un mutante D45) también pierde la competencia respiratoria y, por tanto, la capacidad para crecer en medios con glicerol-etanol como fuentes de carbono no fermentables. Este resultado coincide con lo observado al germinar las esporas D45 en un medio con glicerol-etanol, ya que éstas se dividen al menos 2 a 5 generaciones antes de cesar el crecimiento. Puesto que la respiración no es necesaria durante la germinación de las esporas [Tingle *et al.*, 1974], el mutante D45 puede germinar y dividirse varias veces agotando durante estas generaciones las proteínas P1 y P2 heredadas de su progenitora; durante este período también debe ocurrir el daño en la mitocondria, convirtiéndose en *petite*.

La caracterización de las mitocondrias del mutante D45 *petite* nos permitió observar que el ADN mitocondrial de los mutantes D45 obtenidos por esporulación o por transformación presentaba un patrón característico de ADN degradado; por el contrario, el ADNmit del mutante condicional D45dGP5 hecho *petite* tras el crecimiento en glucosa durante varias generaciones mostraba que parte del genoma mitocondrial se había perdido, pero aún conservaba un patrón de restricción definido, si bien diferente al observado en los parentales silvestres. Podría suceder que una vez que el mutante D45 sufre daños en su

ADNmit, y se convierte en *petite*, continúa perdiendo progresivamente su ADNmit hasta la completa pérdida de la integridad del genoma mitocondrial. Corroborando la observación anterior, en los mutantes D45 *petite* obtenidos mediante esporulación o transformación el gen *COX2* no es detectado mientras que en el mutante D45dGP5 sí es posible, incluso después de 84 horas creciendo en glucosa. No obstante, en estas condiciones las mitocondrias pierden la capacidad para desarrollar el proceso de transcripción y, como consecuencia, se detiene la traducción mitocondrial. La pérdida de la integridad del ADNmit explica también por qué los mutantes D45, una vez que se convierten en *petite*, presentan un fenotipo irreversible. A diferencia del comportamiento del mutante D45, en el mutante D67 sí fue posible obtener una cepa con función respiratoria mitocondrial a partir de esporas germinadas del mutante heterocigoto d6d7. No obstante, es importante hacer notar que la tasa de conversión en células *petite* observada en el mutante D67 diploide (DD67) es bastante superior a la del parental silvestre, pudiendo alcanzar la totalidad de la población celular si no se mantiene en cultivo en condiciones estrictamente respiratorias. Probablemente por esta razón los cultivos derivados de 10 de las 12 esporas D67 haploides obtenidos al inicio de esta investigación (desarrollados en glucosa) habían perdido la función mitocondrial en el momento de verificar su capacidad para crecer en medio YEPGE.

El descubrimiento de que el 100% de los mutantes sin proteínas P2 (D45) y el 83% de los mutantes sin proteínas P1 (D67) creados en el fondo genético SK1 de *S. cerevisiae* eran incapaces de desarrollarse bajo metabolismo estrictamente respiratorio fue algo inesperado y aparentemente característico del fondo genético SK1, ya que en el laboratorio existe una colección de mutantes D45 y D67 obtenidos en diferentes fondos genéticos (W303, SEY6210, Δ pep4 (BJ5458)), y en ninguno de ellos se había observado una relación directa entre la ausencia de las proteínas P y el fallo en la función respiratoria. No obstante, en todos ellos la frecuencia de conversión en células *petite* es superior (hasta el 60%) a la encontrada en otros mutantes del tallo que sí unen proteínas P al ribosoma [M. Remacha, comunicación personal].

Es importante recordar que las levaduras silvestres producen *petite* de manera espontánea [Goldring *et al.*, 1971] y que en *S. cerevisiae* estos valores alcanzan el 1% de la población celular [Sherman, 2002]; no obstante, existen mutantes en los cuales esta frecuencia en la formación de *petite* espontáneos se incrementa notablemente. Todos ellos tienen en común que son mutantes en genes cuyos productos génicos están relacionados con la mitocondria: función, estructura, herencia (fisión y fusión), etc [Myers *et al.*, 1985;

Contamine y Picard, 2000; O'Rourke *et al.*, 2002; Gorsich y Shaw, 2004]. Por tanto, el elevado porcentaje de formación de *petite* espontáneos en los mutantes (D45 y D67) deficientes en proteínas P, constituye una evidencia adicional que relaciona las proteínas P con la mitocondria.

El comportamiento diferencial de los mutantes D45 y D67 aislados en las distintas cepas empleadas en el laboratorio, en relación con el fenotipo *petite*, puede ser explicado basándonos en las observaciones realizadas por Dimitrov y colaboradores (2009), quienes señalan que entre los diferentes fondos genéticos existen pequeñas variantes genéticas que, si bien con pocos efectos fenotípicos individuales, cuando se combinan con otros factores (como podría ser la ausencia de las proteínas P), pueden desencadenar un profundo efecto fenotípico. Intentando determinar qué mutaciones desconocidas presentes en el fondo SK1, en combinación con la ausencia de las proteínas P, estaban desencadenando que los mutantes D45 y D67 se convirtieran en *petite*, transformamos el mutante condicional D45dGP5 con una genoteca preparada a partir de DNA genómico de *S. cerevisiae* W303; no obstante, ningún gen fue rescatado por lo que podríamos pensar que no se trata de una mutación puntual sino de una combinación de varias mutaciones, las que en ausencia de las proteínas P hacen que las levaduras pierdan la competencia respiratoria y se conviertan en *petite*.

Con el propósito de conocer cómo la ausencia de proteínas P1 y P2 genera el fenotipo *petite* el primer planteamiento que se abordó fue saber si este fenotipo está relacionado con las proteínas P unidas al tallo ribosómico o con las proteínas P citosólicas (no unidas al ribosoma). La regulación traduccional mediada por el tallo ribosómico antes mencionada [Remacha *et al.*, 1995a], podría ser la causa de la traducción diferencial de alguna/s proteína/s esencial/es para la función mitocondrial cuya expresión se vería afectada en ausencia de las proteínas P en el tallo ribosómico. Recordemos que de todas las proteínas que constituyen el proteoma de la mitocondria, y por lo tanto que afectan su función, únicamente ocho se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial, estando el resto codificadas en el genoma nuclear [Dimmer *et al.*, 2002; Sickmann *et al.*, 2003]. Puesto que sus productos génicos son traducidos por los ribosomas citoplasmáticos, parece razonable esperar que mutaciones en proteínas ribosómicas puedan afectar la actividad mitocondrial. Existen evidencias que apoyan esta hipótesis, como las que han sido publicadas en el hongo filamentoso *Podospora anserina*; donde una mutación puntual en la proteína ribosómica S12

(homóloga a la S21 de *S. cerevisiae*), ocasiona la pérdida de la función mitocondrial, probablemente de forma indirecta a través de la traducción citoplasmática [Dequard-Chablat y Sellem, 1994]. Por tanto, cualquier alteración en la traducción que implica a los ribosomas citoplasmáticos (como la ausencia de P1/P2 en el tallo ribosómico) podría ocasionar alteraciones de la función de la mitocondria. Sin embargo, tanto el mutante D45 como el D67 tienen ribosomas sin proteínas P, y únicamente en el mutante D45 no es posible obtener células con competencia respiratoria. Por tanto, debemos descartar la ausencia de las proteínas P1/P2 en el ribosoma como la causa única de la disfunción mitocondrial observada. Por el contrario, puesto que el mutante D45 tampoco contiene ninguna de las proteínas P en citosol, ya que las proteínas P1 libres se degradan rápidamente en ausencia de las proteínas P2 [Nusspaumer *et al.*, 2000], pensamos que la incapacidad de las cepas D45 para llevar a cabo la función mitocondrial está más relacionada con la ausencia de proteínas P citosólicas, por lo que hablaríamos entonces de una posible función extrarribosómica de las proteínas P.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo nos permite plantear la hipótesis de que una vez que las proteínas P ya no están presentes en el citoplasma de la levadura ocurre (o deja de ocurrir) algún evento que ocasiona que la transcripción de los genes codificados en el ADN mitocondrial y, como consecuencia, la síntesis de proteína mitocondrial se interrumpan. La traducción mitocondrial es esencial para el mantenimiento del genoma mitocondrial [Myers *et al.*, 1985], debido a que el gradiente electroquímico entre las membranas mitocondriales es indispensable para el transporte hacia la matriz mitocondrial de las proteínas sintetizadas en el citoplasma [Gasser *et al.*, 1982]. Por tanto, una vez que se dejan de sintetizar los complejos respiratorios codificados en el genoma mitocondrial, la fosforilación oxidativa se detiene y con ello ocurre la pérdida del potencial de membrana mitocondrial [Merz y Westermann, 2009] por lo que los productos de los genes nucleares encargados de la replicación y reparación del ADN mitocondrial no pueden ser transportados a la mitocondria y esto desencadenaría el daño en el ADN mitocondrial observado en los mutantes D45.

V.2 LOS MUTANTES D45 ACUMULAN P0 EN MITOCONDRIA

Durante la caracterización estructural/funcional de las mitocondrias aisladas del mutante D45 nos encontramos con una acumulación de la proteína ribosómica P0 tanto en

las mitocondrias del parental silvestre como en algunos mutantes del tallo ribosómico, siendo considerablemente mayor en estos últimos. La presencia intramitocondrial de esta proteína podría estar asociada al defecto mitocondrial observado en los mutantes D45 y D67. Puesto que P0 ha sido descrita como una endonucleasa apurinica/apirimidinica [Yacoub *et al.*, 1996] en *Drosophila melanogaster*, una función endonucleasa en la mitocondria podría justificar las deleciones observadas en el ADN mitocondrial. Alternativamente existen evidencias experimentales en nuestro laboratorio que señalan que la proteína P0 es capaz de interaccionar con el sitio GTPasa de los ribosomas de *E. coli* (datos no publicados), pero que estos ribosomas híbridos son inactivos. Si se extrapola este resultado a los ribosomas mitocondriales, [Sor y Fukuhara, 1983], la unión de P0 a los ribosomas mitocondriales generaría híbridos no funcionales que bloquearían la traducción mitocondrial. No obstante, al menos en *S. cerevisiae*, ninguna de estas dos hipótesis pudo ser validada por datos experimentales. Así, en contra de lo que sucede con la proteína P0 de *D. melanogaster*, resultados no publicados obtenidos en el laboratorio demostraron que la proteína P0 de *S. cerevisiae* no posee actividad endonucleasa [MA Rodríguez-Gabriel, comunicación personal]. La segunda hipótesis también la descartamos ya que aunque P0 co-purifica con membrana mitocondrial interna, coincidiendo con la ubicación de los ribosomas mitocondriales [Ott *et al.*, 2006], no se aísla en los mitoribosomas; más bien parece estar formando agregados de naturaleza proteica. La formación de agregados de esta proteína podría explicarse por su baja solubilidad en ausencia de las proteínas P [Uchiumi y Kominami, 1997; Krokowski *et al.*, 2005]. De hecho hemos comprobado que esta deslocalización de P0 también se observa, en pequeña cantidad en células silvestres, acumulándose en cepas (*grande*) que o bien no expresan los “heterodímeros” de preferencia (D45, D67 y D4567) o que, expresándolos, no pueden unirse a P0 (P0 Δ AB). Asimismo, estos agregados se observan también cuando se sobreexpresa P0 (dGPO). Por lo tanto, la acumulación intramitocondrial de P0 en el mutante D45 no está relacionada con el fenotipo *petite* sino con su baja solubilidad en ausencia de P1/P2.

V.3 EN AUSENCIA DE LAS PROTEÍNAS P DEL TALLO RIBOSÓMICO NO SE DESARROLLA LA ESPORULACIÓN

El fenotipo *petite* de los mutantes DD45 nos impidió estudiar directamente la influencia de las proteínas P en la esporulación, pues tal como se ha discutido anteriormente

la competencia respiratoria es esencial para que se desarrolle este proceso. No obstante, la caracterización del mutante D45 nos permitió establecer condiciones de cultivo en las cuales los mutantes carecían de proteínas P2 pero aún eran capaces de respirar. Así, desde el momento en el que el mutante condicional DD45dGP5 (cultivado en galactosa) es transferido a un medio de cultivo con glucosa, han de transcurrir 24-36 horas para que la proteína P2 β sea indetectable. El estudio temporal de la capacidad respiratoria de estos mutantes reveló que hasta las 36-48 horas son capaces de respirar, estando el cultivo compuesto por una mezcla a partes iguales de células *grande* y *petite* al cabo de 36 horas de crecimiento en glucosa. Se fijaron estas condiciones, estudiando la esporulación del mutante DD45dGP5 incubado durante 36 horas en glucosa antes de transferir a condiciones de esporulación. Los resultados mostraron que apenas un 3% de las células llegaron a esporular, formando tétradas visibles; no obstante, debido a que el porcentaje de células *petite* presentes en estas condiciones alcanza el 50% de la población celular, la tasa de esporulación está subestimada en la misma proporción. Extrapolando a una situación en la que la totalidad de las células del cultivo conservaran la actividad respiratoria mitocondrial, el porcentaje de esporulación alcanzaría el 6%. Esta baja eficiencia de esporulación es similar a la obtenida con el mutante DD67, en comparación con la observada para el parental silvestre que muestra un porcentaje de esporulación aproximadamente del 70% en las mismas condiciones experimentales.

Estos resultados parecen contradictorios con los publicado por Remacha y colaboradores (1995), donde describen que las levaduras que no poseen proteínas P asociadas al tallo no son capaces de esporular. Sin embargo, cabe razonar que un descenso del 90% en el porcentaje de esporulación haría que la detección de ésta en el fondo genético W303 pueda resultar imperceptible. Puesto que la tasa de esporulación del silvestre solo alcanza el 10-12%, en condiciones óptimas de esporulación [Ben-Ari *et al.*, 2006], un descenso del 90% resultaría en una eficiencia de esporulación inferior al 1% de las células, que podrían pasar desapercibidas al visualizar las preparaciones al microscopio.

El hecho que los mutantes D45 y D67 no esporulen confirma, por tanto, que las proteínas P son necesarias para que se desarrolle este proceso. Al igual que se ha comentado al analizar el efecto mitocondrial, el defecto en la esporulación puede ser debido a las proteínas libres o asociadas al tallo ribosómico. Recordemos nuevamente las diferencias que existen entre estos dos mutantes del tallo: si bien ambos carecen de proteínas ácidas asociadas del ribosoma, se diferencian en que D67 contiene las proteínas P2 libres mientras

que D45 no contiene ninguna de ellas. El defecto en la esporulación, por tanto podría ser consecuencia de que las proteínas P1 y P2 no estén formando parte del tallo ribosómico o puede ser debido a su ausencia en el citosol. Para distinguir entre estas dos posibilidades estudiamos la esporulación en el mutante P0 Δ AB, donde las proteínas P1 y P2 se encuentran libres en el citoplasma formando heterodímeros P1/P2 pero no pueden unirse a P0 [Cárdenas, 2008]. Puesto que esta cepa sí es capaz de esporular, este resultado sugiere que son las proteínas P libres las necesarias para que se desarrolle el proceso de la esporulación.

Nuevamente estos resultados sugieren que las proteínas P tienen una función extrarribosómica, asociada al proceso de esporulación, cabiendo la posibilidad de que ésta sea ejercida por las proteínas P1 libres (la cepa D67, con proteínas P2, no esporula) o por el heterodímero P1/P2 (ausente tanto en D45 como en D67). Sin embargo la primera opción debería ser descartada puesto que en una cepa silvestre de *S. cerevisiae* las proteínas P1 no se encuentran libres en el citosol debido a su elevada susceptibilidad a la degradación [Nusspaumer *et al.*, 2000], de manera que se encuentran formando los heterodímeros preferentes P1 α •P2 β , y P1 β •P2 α [Tchorzewski *et al.*, 2000a; Lalioti *et al.*, 2002; Cárdenas, 2008]. Es de esperar por tanto que las proteínas P intervengan positivamente en el desarrollo de la esporulación a través de los heterodímeros P1/P2, o complejos de éstos entre sí o con otras proteínas.

Existen evidencias que han relacionado a las proteínas P libres en el citoplasma con otros componentes proteicos del citosol [Cárdenas, 2008; Francisco-Velilla, 2009]. Así, usando la proteína P2 β como cebo, junto a ella copurificaron otras 15 proteínas a partir de un extracto celular sin ribosomas [Cárdenas, 2008], de las cuales tres (Gpm1, Emi2 y Vma2), han sido implicadas directa o indirectamente con la esporulación [Dickinson y Williams, 1986; Enyenihi y Saunders, 2003]. La proteína Gpm1 (fosfoglicerato mutasa) es una enzima de la gluconeogénesis, proceso metabólico que junto con la respiración actúa como modulador de la expresión de Ime1, activador transcripcional de la esporulación [Cortassa *et al.*, 2000; Dickinson y Williams, 1986]. Emi2 es una proteína con función desconocida, necesaria para la inducción de la transcripción de Ime1 [Enyenihi y Saunders, 2003]. Estas dos proteínas, con las que aparentemente interacciona la proteína P2 β , están directamente relacionadas con el factor de transcripción Ime1, el cual es activado en las etapas tempranas del proceso de esporulación, siendo indispensable su activación para que se inicie la esporulación [Neigeborn y Mitchell, 1991].

Por último, la proteína Vma2 (proteína que forma parte del dominio V₁ de la ATPasa vacuolar) ha sido descrita interaccionando tanto con la proteína P2β libre [Cárdenas, 2008] como con el complejo pentamérico (P1α•P2β•P0•P1β•P2α) [Francisco-Velilla, 2009]. Vma2 es un componente esencial para que se desarrolle la esporulación, ya que la función vacuolar es importante para la supervivencia de la levadura en las condiciones de escasez de nutrientes en las que se desarrolla el proceso de esporulación [Enyenihi y Saunders, 2003].

Por tanto existen conexiones que relacionan directamente las proteínas P con proteínas implicadas en la esporulación, si bien queda pendiente elucidar el significado funcional de estas interacciones. Resultados preliminares sugieren que la expresión de Ime1 se ve afectada en los mutantes D45/D67. La regulación de la expresión de este gen es muy compleja, pues en ella se integran las múltiples señales que la célula debe captar para iniciar el proceso de esporulación. En condiciones de esporulación la tasa de síntesis de proteínas es baja; en estas condiciones los ribosomas contienen una menor cantidad de proteínas P asociadas a ribosoma [Saenz-Robles *et al.*, 1990]. El aumento de proteínas P1/P2 libres permitiría interacciones proteicas que normalmente están ausentes en la célula en crecimiento activo que finalmente redundarían en la regulación de Ime1. Si bien es prematuro afirmar cuál de las rutas de activación de esta proteína es la que se ve afectada por la ausencia de las proteínas P, resulta cuando menos interesante plantear la posibilidad de que éstos componentes ribosómicos podrían actuar como sensores celulares.

VI. *Conclusiones*

- 1 . Las proteínas P no asociadas a los ribosomas son necesarias para que se desarrolle el proceso de esporulación en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, indicando una posible función extrarribosómica para las proteínas P.
- 2 . La desaparición de las proteínas P libres, no unidas a ribosoma, desencadena fallos en la función mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3 . Los mutantes D45 del fondo genético SK1 poseen un fenotipo *petite* irreversible, siendo del tipo ρ^- .
- 4 . La imposibilidad de obtener un mutante D45 con competencia *respiratoria* constituye una característica exclusiva del fondo genético SK1, posiblemente ocasionado por la presencia de algún componente genético que, combinado con la falta de las proteínas P, desencadena la pérdida de la función mitocondrial.
- 5 . La proteína P0 se encuentra en las mitocondrias de todas las cepas donde P0 no pueda formar el tallo ribosómico con las proteínas P, o cuando se encuentra expresada en mayor cantidad.
- 6 . La proteína P0 es detectada formando complejos proteicos que copurifican con la membrana interna mitocondrial.

VII. *Sibliografia*

- AGRAWAL R. K., SPAHN C. M., PENCZEK P., GRASSUCCI R. A., NIERHAUS K. H., Y FRANK J. **(2000)**. Visualization of tRNA movements on the *Escherichia coli* 70S ribosome during the elongation cycle. *J Cell Biol*, 150(3): 447-460.
- ALTMANN K., Y WESTERMANN B. **(2005)**. Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 16(11): 5410-5417.
- ALLAN V. J. **(2000)**. Protein localization by fluorescence microscopy: A practical approach. Chapter 8: Fluorescence microscopy in yeast. New York: *Oxford University Press US*.
- ARECHAGA I., RAIMBAULT S., PRIETO S., LEVI-MEYRUEIS C., ZARAGOZA P., MIROUX B., RICQUIER D., BOUILLAUD F., Y RIAL E. **(1993)**. Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function. *Biochem J*, 296 (Pt 3): 693-700.
- AYUB M. J., BARROSO J. A., LEVIN M. J., Y AGUILAR C. F. **(2005)**. Preliminary structural studies of the hydrophobic ribosomal P0 protein from *Trypanosoma cruzi*, a part of the P0/P1/P2 complex. *Protein Pept Lett*, 12(6): 521-525.
- BAILEY-SERRES J., VANGALA S., SZICK K., Y LEE C. H. **(1997)**. Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. Components and changes in response to flooding. *Plant Physiol*, 114(4): 1293-1305.
- BALLESTA J. P., Y REMACHA M. **(1996)**. The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of the eukaryotic translational machinery. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 55: 157-193.
- BALLESTA J. P., RODRIGUEZ-GABRIEL M. A., BOU G., BRIONES E., ZAMBRANO R., Y REMACHA M. **(1999)**. Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. *FEMS Microbiol Rev*, 23(5): 537-550.
- BAN N., NISSEN P., HANSEN J., MOORE P. B., Y STEITZ T. A. **(2000)**. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289(5481): 905-920.
- BARGIS-SURGEY P., LAVERGNE J. P., GONZALO P., VARD C., FILHOL-COCHET O., Y REBOUD J. P. **(1999)**. Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins. *Eur J Biochem*, 262(2): 606-611.
- BARNARD G. F., STANIUNAS R. J., BAO S., MAFUNE K., STEELE G. D., JR., GOLLAN J. L., Y CHEN L. B. **(1992)**. Increased expression of human ribosomal phosphoprotein P0 messenger RNA in hepatocellular carcinoma and colon carcinoma. *Cancer Res*, 52(11): 3067-3072.
- BECKER D. M., Y LUNDBLAD V. **(1993)**. Manipulation of yeast genes section III. Introduction of DNA into yeast cells. *Current Protocols in Molecular Biology*: 13.17.11 - 13.17.10.
- BELTRAME M., Y BIANCHI M. E. **(1990)**. A gene family for acidic ribosomal proteins in *Schizosaccharomyces pombe*: two essential and two nonessential genes. *Mol Cell Biol*, 10(5): 2341-2348.
- BEN-ARI G., ZENVIRTH D., SHERMAN A., DAVID L., KLUTSTEIN M., LAVI U., HILLEL J., Y SIMCHEN G. **(2006)**. Four linked genes participate in controlling sporulation efficiency in budding yeast. *PLoS Genet*, 2(11): e195.
- BEN-SHEM A., JENNER L., YUSUPOVA G., Y YUSUPOV M. **(2010)**. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*, 330(6008): 1203-1209.
- BENJAMIN K. R., ZHANG C., SHOKAT K. M., Y HERSKOWITZ I. **(2003)**. Control of landmark events in meiosis by the CDK Cdc28 and the meiosis-specific kinase Ime2. *Genes Dev*, 17(12): 1524-1539.
- BERMEJO B. **(1992)**. Expresión de genes homólogos y heterólogos de proteínas ácidas ribosómicas en *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid - España.
- BHAT P. J., Y HOPPER J. E. **(1991)**. The mechanism of inducer formation in gal3 mutants of the yeast galactose system is independent of normal galactose metabolism and mitochondrial respiratory function. *Genetics*, 128(2): 233-239.
- BIELKA H. **(1982)**. The eukaryotic ribosome. Berling, Heidelberg: *Springer-Verlang. New York*.
- BLUMENTHAL T., Y CARMICHAEL G. G. **(1979)**. RNA replication: function and structure of Qbeta-replicase. *Annu Rev Biochem*, 48: 525-548.

- BOCHAROV E. V., SOBOL A. G., PAVLOV K. V., KORZHNEV D. M., JARAVINE V. A., GUDKOV A. T., Y ARSENIIEV A. S. (2004). From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J Biol Chem*, 279(17): 17697-17706.
- BORST P., Y GRIVELL L. A. (1978). The mitochondrial genome of yeast. *Cell*, 15(3): 705-723.
- BRADFORD M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- BRICENO V., CAMARGO H., REMACHA M., SANTOS C., Y BALLESTA J. P. (2009). Structural and functional characterization of the amino terminal domain of the yeast ribosomal stalk P1 and P2 proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(6): 1315-1322.
- CAMARGO H., NUSSPAUMER G., ABIA D., BRICENO V., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. (2011). The amino terminal end determines the stability and assembling capacity of eukaryotic ribosomal stalk proteins P1 and P2. *Nucleic Acids Res*.
- CÁRDENAS D. B. (2008). Estudio del ensamblaje del tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*. Caracterización de las interacciones de sus componentes. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid - España.
- CARVALHO C. M., SANTOS A. A., PIRES S. R., ROCHA C. S., SARAIVA D. I., MACHADO J. P., MATTOS E. C., FIETTO L. G., Y FONTES E. P. (2008). Regulated nuclear trafficking of rpl10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathog*, 4(12): e1000247.
- CAVERO S., TRABA J., DEL ARCO A., Y SATRUSTEGUI J. (2005). The calcium-dependent ATP-Mg/Pi mitochondrial carrier is a target of glucose-induced calcium signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 392(Pt 3): 537-544.
- CODON A. C., GASENT-RAMIREZ J. M., Y BENITEZ T. (1995). Factors Which Affect the Frequency of Sporulation and Tetrad Formation in *Saccharomyces cerevisiae* Baker's Yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 61(4): 1677.
- COLLART M. A., Y OLIVIERO S. (2001). Preparation of Yeast RNA. . *Current Protocols in Molecular Biology* 13.12.11–13.12.15.
- CONTAMINE V., Y PICARD M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(2): 281-315.
- CORTASSA S., AON J. C., AON M. A., Y SPENCER J. F. (2000). Dynamics of metabolism and its interactions with gene expression during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Microb Physiol*, 43: 75-115.
- CHAKRABURTTY K. (2001). Translational regulation by ABC systems. *Res Microbiol*, 152(3-4): 391-399.
- CHEN X. J., Y CLARK-WALKER G. D. (2000). The petite mutation in yeasts: 50 years on. *Int Rev Cytol*, 194: 197-238.
- CHU S., DERISI J., EISEN M., MULHOLLAND J., BOTSTEIN D., BROWN P. O., Y HERSKOWITZ I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*, 282(5389): 699-705.
- CHU S., Y HERSKOWITZ I. (1998). Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Mol Cell*, 1(5): 685-696.
- DAUM G., BOHNI P. C., Y SCHATZ G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 257(21): 13028-13033.
- DE LA CRUZ J., IOST I., KRESSLER D., Y LINDER P. (1997). The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10): 5201-5206.
- DEFONTAINE A., LECOCQ F. M., Y HALLET J. N. (1991). A rapid miniprep method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 19(1): 185.
- DEQUARD-CHABLAT M., Y SELLEM C. H. (1994). The S12 ribosomal protein of *Podospora anserina* belongs to the S19 bacterial family and controls the mitochondrial genome integrity through cytoplasmic translation. *J Biol Chem*, 269(21): 14951-14956.

- DERISI J. L., IYER V. R., Y BROWN P. O. **(1997)**. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278(5338): 680-686.
- DEUTSCHBAUER A. M., WILLIAMS R. M., CHU A. M., Y DAVIS R. W. **(2002)**. Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24): 15530-15535.
- DIACONU M., KOTHE U., SCHLUNZEN F., FISCHER N., HARMS J. M., TONEVITSKY A. G., STARK H., RODNINA M. V., Y WAHL M. C. **(2005)**. Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell*, 121(7): 991-1004.
- DICKINSON J. R., Y WILLIAMS A. S. **(1986)**. A genetic and biochemical analysis of the role of gluconeogenesis in sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, 132(9): 2605-2610.
- DIMITROV L. N., BREM R. B., KRUGLYAK L., Y GOTTSCHLING D. E. **(2009)**. Polymorphisms in multiple genes contribute to the spontaneous mitochondrial genome instability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C strains. *Genetics*, 183(1): 365-383.
- DIMMER K. S., FRITZ S., FUCHS F., MESSERSCHMITT M., WEINBACH N., NEUPERT W., Y WESTERMANN B. **(2002)**. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 13(3): 847-853.
- DIMMER K. S., Y RAPAPORT D. **(2008)**. Proteomic view of mitochondrial function. *Genome Biol*, 9(2): 209.
- DONNINI C., LODI T., FERRERO I., ALGERI A., Y PUGLISI P. P. **(1992)**. Allelism of IMP1 and GAL2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 174(10): 3411-3415.
- DOUDNA J. A., Y RATH V. L. **(2002)**. Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier. *Cell*, 109(2): 153-156.
- DOUGLAS H. C., Y PELROY G. **(1963)**. A gene controlling inducibility of the galactose pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 68: 155-156.
- ELKON K. B., PARNASSA A. P., Y FOSTER C. L. **(1985)**. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med*, 162(2): 459-471.
- ENYENIHI A. H., Y SAUNDERS W. S. **(2003)**. Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 163(1): 47-54.
- EPHRUSSI B., HIOTTINGUER H., Y CHIMENES Y. **(1949)**. Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutatuin "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur*, 76: 351-367.
- ESPOSITO M. S., ESPOSITO R. E., ARNAUD M., Y HALVORSON H. O. **(1969)**. Acetate utilization and macromolecular synthesis during sporulation of yeast. *J Bacteriol*, 100(1): 180-186.
- FOURY F., ROGANTI T., LECRENIER N., Y PURNELLE B. **(1998)**. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 440(3): 325-331.
- FRANCISCO-VELILLA R. **(2009)**. Estudio del ensamblaje pre-ribosómico de las proteínas P de *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid - España.
- FRANCISCO-VELILLA R., Y REMACHA M. **(2010)**. *In vivo* formation of a stable pentameric (P2alpha/P1beta)-P0-(P1alpha/P2beta) ribosomal stalk complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 27(9): 693-704.
- FRIEDLANDER G., JOSEPH-STRAUSS D., CARMİ M., ZENVIRTH D., SIMCHEN G., Y BARKAI N. **(2006)**. Modulation of the transcription regulatory program in yeast cells committed to sporulation. *Genome Biol*, 7(3): R20.
- FROLOV M. V., Y BIRCHLER J. A. **(1998)**. Mutation in P0, a dual function ribosomal protein/apurinic/aprimidinic endonuclease, modifies gene expression and position effect variegation in *Drosophila*. *Genetics*, 150(4): 1487-1495.
- FUGE E. K., BRAUN E. L., Y WERNER-WASHBURNE M. **(1994)**. Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 176(18): 5802-5813.

- GARCÍA-MARCOS A. (2005). Estudios *in vivo* e *in vitro* del tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae* mediante técnicas biofísicas y bioquímicas. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid - España.
- GARCIA-MARCOS A., SANCHEZ S. A., PARADA P., EID J., JAMESON D. M., REMACHA M., GRATTON E., Y BALLESTA J. P. (2008). Yeast ribosomal stalk heterogeneity *in vivo* shown by two-photon FCS and molecular brightness analysis. *Biophys J*, 94(7): 2884-2890.
- GASSER S. M., DAUM G., Y SCHATZ G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 257(21): 13034-13041.
- GIETZ R. D., SCHIESTL R. H., WILLEMS A. R., Y WOODS R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11(4): 355-360.
- GOLDRING E. S., GROSSMAN L. I., Y MARMUR J. (1971). Petite mutation in yeast. II. Isolation of mutants containing mitochondrial deoxyribonucleic acid of reduced size. *J Bacteriol*, 107(1): 377-381.
- GOMEZ-LORENZO M. G., SPAHN C. M., AGRAWAL R. K., GRASSUCCI R. A., PENCZEK P., CHAKRABURTTY K., BALLESTA J. P., LAVANDERA J. L., GARCIA-BUSTOS J. F., Y FRANK J. (2000). Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *Embo J*, 19(11): 2710-2718.
- GONZALO P., LAVERGNE J. P., Y REBOUD J. P. (2001). Pivotal role of the P1 N-terminal domain in the assembly of the mammalian ribosomal stalk and in the proteosynthetic activity. *J Biol Chem*, 276(23): 19762-19769.
- GORSICH S. W., Y SHAW J. M. (2004). Importance of mitochondrial dynamics during meiosis and sporulation. *Mol Biol Cell*, 15(10): 4369-4381.
- GREGG C., KYRYAKOV P., Y TITORENKO V. I. (2009). Purification of mitochondria from yeast cells. *J Vis Exp*(30).
- GRIAZNOVA O., Y TRAUT R. R. (2000). Deletion of C-terminal residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L10 causes the loss of binding of one L7/L12 dimer: ribosomes with one L7/L12 dimer are active. *Biochemistry*, 39(14): 4075-4081.
- GRUSCHKE S., GRONE K., HEUBLEIN M., HOLZ S., ISRAEL L., IMHOF A., HERRMANN J. M., Y OTT M. (2010). Proteins at the polypeptide tunnel exit of the yeast mitochondrial ribosome. *J Biol Chem*, 285(25): 19022-19028.
- GRUSCHKE S., Y OTT M. (2010). The polypeptide tunnel exit of the mitochondrial ribosome is tailored to meet the specific requirements of the organelle. *Bioessays*, 32(12): 1050-1057.
- GUARINOS E. (1999). El tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudio estructural y funcional. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid - España.
- GUARINOS E., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. (2001). Asymmetric interactions between the acidic P1 and P2 proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk. *J Biol Chem*, 276(35): 32474-32479.
- GUARINOS E., SANTOS C., SANCHEZ A., QIU D. Y., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. (2003). Tag-mediated fractionation of yeast ribosome populations proves the monomeric organization of the eukaryotic ribosomal stalk structure. *Mol Microbiol*, 50(2): 703-712.
- GULDENER U., HECK S., FIELDER T., BEINHAEUER J., Y HEGEMANN J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 24(13): 2519-2524.
- HANAHAN D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4): 557-580.
- HANAHAN D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. DNA cloning: a practical approach.: D.M. Glover. Oxford IRL Press.
- HELGSTRAND M., MANDAVA C. S., MULDER F. A., LILJAS A., SANYAL S., Y AKKE M. (2007). The ribosomal stalk binds to translation factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a conserved region of the L12 C-terminal domain. *J Mol Biol*, 365(2): 468-479.

- HERRMANN J. M., STUART R. A., CRAIG E. A., Y NEUPERT W. **(1994)**. Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *J Cell Biol*, 127(4): 893-902.
- HERRMANN J. M., KOLL H., COOK R. A., NEUPERT W., Y STUART R. A. **(1995)**. Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J Biol Chem*, 270(45): 27079-27086.
- ILAG L. L., VIDELER H., MCKAY A. R., SOBOTT F., FUCINI P., NIERHAUS K. H., Y ROBINSON C. V. **(2005)**. Heptameric (L12)6/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(23): 8192-8197.
- ITO H., FUKUDA Y., MURATA K., Y KIMURA A. **(1983)**. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 153(1): 163-168.
- JAMBHEKAR A., Y AMON A. **(2008)**. Control of meiosis by respiration. *Curr Biol*, 18(13): 969-975.
- JIMENEZ A., Y DAVIES J. **(1980)**. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, 287(5785): 869-871.
- JOSE M. P., SANTANA-ROMAN H., REMACHA M., BALLESTA J. P., Y ZINKER S. **(1995)**. Eukaryotic acidic phosphoproteins interact with the ribosome through their amino-terminal domain. *Biochemistry*, 34(24): 7941-7948.
- KISS E., Y SHOENFELD Y. **(2007)**. Are anti-ribosomal P protein antibodies relevant in systemic lupus erythematosus? *Clin Rev Allergy Immunol*, 32(1): 37-46.
- KOTELIANSKY V. E., DOMOGATSKY S. P., Y GUDKOV A. T. **(1978)**. Dimer state of protein L7/L12 and EF-G-dependent reactions of ribosomes. *Eur J Biochem*, 90(2): 319-323.
- KROKOWSKI D., TCHORZEWSKI M., BOGUSZEWSKA A., Y GRANKOWSKI N. **(2005)**. Acquisition of a stable structure by yeast ribosomal P0 protein requires binding of P1A-P2B complex: *in vitro* formation of the stalk structure. *Biochim Biophys Acta*, 1724(1-2): 59-70.
- KROKOWSKI D., BOGUSZEWSKA A., ABRAMCZYK D., LILJAS A., TCHORZEWSKI M., Y GRANKOWSKI N. **(2006)**. Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Mol Microbiol*, 60(2): 386-400.
- KROKOWSKI D., TCHORZEWSKI M., BOGUSZEWSKA A., MCKAY A. R., MASLEN S. L., ROBINSON C. V., Y GRANKOWSKI N. **(2007)**. Elevated copy number of L-A virus in yeast mutant strains defective in ribosomal stalk. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(2): 575-580.
- KUHN J. F., TRAN E. J., Y MAXWELL E. S. **(2002)**. Archaeal ribosomal protein L7 is a functional homolog of the eukaryotic 15.5kD/Snu13p snoRNP core protein. *Nucleic Acids Res*, 30(4): 931-941.
- LALIOTI V. S., PEREZ-FERNANDEZ J., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. **(2002)**. Characterization of interaction sites in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk components. *Mol Microbiol*, 46(3): 719-729.
- LEVIN M. J., VAZQUEZ M., KAPLAN D., Y SCHIJMAN A. G. **(1993)**. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: classification and antigenicity. *Parasitol Today*, 9(10): 381-384.
- LIPINSKI K. A., KANIAK-GOLIK A., Y GOLIK P. **(2010)**. Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome--from genetics to evolution and systems biology. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7): 1086-1098.
- LOCKER J., SYNENKI R. M., MERTEN S., Y RABINOWITZ M. **(1981)**. Eukaryotic features of mitochondrial transcription and gene structure in yeast. *Ann N Y Acad Sci*, 361: 105-118.
- MAGER W. H., PLANTA R. J., BALLESTA J. G., LEE J. C., MIZUTA K., SUZUKI K., WARNER J. R., Y WOOLFORD J. **(1997)**. A new nomenclature for the cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 25(24): 4872-4875.
- MAKI Y., HASHIMOTO T., ZHOU M., NAGANUMA T., OHTA J., NOMURA T., ROBINSON C. V., Y UCHIUMI T. **(2007)**. Three binding sites for stalk protein dimers are generally present in ribosomes from archaeal organism. *J Biol Chem*, 282(45): 32827-32833.

- MARMIROLI N., FERRI M., Y PUGLISI P. P. **(1983)**. Involvement of mitochondrial protein synthesis in sporulation: effects of erythromycin on macromolecular synthesis, meiosis, and ascospore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 154(1): 118-129.
- MARMIROLI N., Y LODI T. **(1984)**. Modification of nuclear gene expression by inhibition of mitochondrial translation during sporulation in MAT alpha/MATa diploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 198(1): 69-74.
- MARQUIS D. M., FAHNESTOCK S. R., HENDERSON E., WOO D., SCHWINGE S., CLARK M. W., Y LAKE J. A. **(1981)**. The L7/L12 stalk, a conserved feature of the prokaryotic ribosome, is attached to the large subunit through its N terminus. *J Mol Biol*, 150(1): 121-132.
- MARZOCHELLA L., SINI V., BUONOMO O., ORLANDI A., MASUELLI L., BONANNO E., LISTA F., TURRIZIANI M., MANZARI V., ROSELLI M., MODESTI A., Y BEI R. **(2011)**. Spontaneous immunogenicity of ribosomal P0 protein in patients with benign and malignant breast lesions and delay of mammary tumor growth in P0-vaccinated mice. *Cancer Sci*, 102(3): 509-515.
- MAZUMDER B., SAMPATH P., SESHADRI V., MAITRA R. K., DICORLETO P. E., Y FOX P. L. **(2003)**. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell*, 115(2): 187-198.
- MERZ S., Y WESTERMANN B. **(2009)**. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol*, 10(9): R95.
- MITCHELL A. P. **(1994)**. Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 58(1): 56-70.
- MITSUI K., NAKAGAWA T., Y TSURUGI K. **(1988)**. On the size and the role of a free cytosolic pool of acidic ribosomal proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem*, 104(6): 908-911.
- MIYAKAWA I., AOI H., SANDO N., Y KUROIWA T. **(1984)**. Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 66: 21-38.
- MOKRANJAC D., Y NEUPERT W. **(2008)**. Energetics of protein translocation into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1777(7-8): 758-762.
- MOLLER W., SCHRIER P. I., MAASSEN J. A., ZANTEMA A., SCHOP E., REINALDA H., CREMERS A. F., Y MELLEMA J. E. **(1983)**. Ribosomal proteins L7/L12 of *Escherichia coli*. Localization and possible molecular mechanism in translation. *J Mol Biol*, 163(4): 553-573.
- MOLLER W. **(1991)**. Functional aspects of ribosomal proteins. *Biochimie*, 73(7-8): 1093-1100.
- MOORE D. D., BRENT R., AUSUBEL F. M., Y SMITH J. A. **(2002)**. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. Unit 13-11: *Saccharomyces cerevisiae*. 5th ed.: Wiley. John & Sons, Incorporated.
- MOORE P. B., Y STEITZ T. A. **(2003)**. The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu Rev Biochem*, 72: 813-850.
- MYERS A. M., PAPE L. K., Y TZAGOLOFF A. **(1985)**. Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 4(8): 2087-2092.
- NEIGEBORN L., Y MITCHELL A. P. **(1991)**. The yeast MCK1 gene encodes a protein kinase homolog that activates early meiotic gene expression. *Genes Dev*, 5(4): 533-548.
- NEIMAN A. M., KATZ L., Y BRENNWALD P. J. **(2000)**. Identification of domains required for developmentally regulated SNARE function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 155(4): 1643-1655.
- NEIMAN A. M. **(2005)**. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69(4): 565-584.
- NELSON D. L., Y COX M. M. **(2000)**. Lehninger Principles of Biochemistry. San Francisco.
- NEWTON C. H., SHIMMIN L. C., YEE J., Y DENNIS P. P. **(1990)**. A family of genes encode the multiple forms of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins equivalent to the *Escherichia*

- coli* L12 protein and a single form of the L10-equivalent ribosomal protein. *J Bacteriol*, 172(2): 579-588.
- NILSSON J., SENGUPTA J., GURSKY R., NISSEN P., Y FRANK J. **(2007)**. Comparison of fungal 80 S ribosomes by cryo-EM reveals diversity in structure and conformation of rRNA expansion segments. *J Mol Biol*, 369(2): 429-438.
- NOMURA T., NAKATSUCHI M., SUGITA D., NOMURA M., KAMINISHI T., TAKEMOTO C., SHIROUZU M., MIYOSHI T., YOKOYAMA S., HACHIMORI A., Y UCHIUMI T. **(2008)**. Biochemical evidence for the heptameric complex L10(L12)₆ in the *Thermus thermophilus* ribosome: *in vitro* analysis of its molecular assembly and functional properties. *J Biochem*, 144(5): 665-673.
- NUSSPAUMER G. **(1999)**. Control de la expresión de las proteínas ribosómicas P1/P2 en *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid - España.
- NUSSPAUMER G., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. **(2000)**. Phosphorylation and N-terminal region of yeast ribosomal protein P1 mediate its degradation, which is prevented by protein P2. *EMBO J*, 19(22): 6075-6084.
- O'ROURKE T. W., DOUDICAN N. A., MACKERETH M. D., DOETSCH P. W., Y SHADEL G. S. **(2002)**. Mitochondrial dysfunction due to oxidative mitochondrial DNA damage is reduced through cooperative actions of diverse proteins. *Mol Cell Biol*, 22(12): 4086-4093.
- OGUR M., ST. JOHN R., Y NAGAI S. **(1957)**. Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science*, 125(3254): 928-929.
- OKAMOTO K., Y SHAW J. M. **(2005)**. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 39: 503-536.
- OTT M., PRESTLE M., BAUERSCHMITT H., FUNES S., BONNEFOY N., Y HERRMANN J. M. **(2006)**. Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J*, 25(8): 1603-1610.
- OTT M., Y HERRMANN J. M. **(2010)**. Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1803(6): 767-775.
- PÉREZ-FERNÁNDEZ J., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. **(2005)**. The acidic protein binding site is partially hidden in the free *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk protein P0. *Biochemistry*, 44(14): 5532-5540.
- PIEKARSKA I., RYTKA J., Y REMPOLA B. **(2010)**. Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol*, 57(3): 241-250.
- PLANTA R. J., Y MAGER W. H. **(1998)**. The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(5): 471-477.
- POYTON R. O., Y MCEWEN J. E. **(1996)**. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem*, 65: 563-607.
- RAMAKRISHNAN V. **(2002)**. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108(4): 557-572.
- RAWAT U. B., ZAVIALOV A. V., SENGUPTA J., VALLE M., GRASSUCCI R. A., LINDE J., VESTERGAARD B., EHRENBERG M., Y FRANK J. **(2003)**. A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature*, 421(6918): 87-90.
- REMACHA M., SAENZ-ROBLES M. T., VILELLA M. D., Y BALLESTA J. P. **(1988)**. Independent genes coding for three acidic proteins of the large ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 263(19): 9094-9101.
- REMACHA M., SANTOS C., Y BALLESTA J. P. **(1990)**. Disruption of single-copy genes encoding acidic ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 10(5): 2182-2190.
- REMACHA M., SANTOS C., BERMEJO B., NARANDA T., Y BALLESTA J. P. **(1992)**. Stable binding of the eukaryotic acidic phosphoproteins to the ribosome is not an absolute requirement for *in vivo* protein synthesis. *J Biol Chem*, 267(17): 12061-12067.
- REMACHA M., JIMENEZ-DÍAZ A., BERMEJO B., RODRIGUEZ-GABRIEL M. A., GUARINOS E., Y BALLESTA J. P. **(1995a)**. Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability

- but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 15(9): 4754-4762.
- REMACHA M., JIMENEZ-DIAZ A., SANTOS C., BRIONES E., ZAMBRANO R., RODRIGUEZ GABRIEL M. A., GUARINOS E., Y BALLESTA J. P. **(1995b)**. Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem Cell Biol*, 73(11-12): 959-968.
- RICH B. E., Y STEITZ J. A. **(1987)**. Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, *in vitro* synthesis, and assembly. *Mol Cell Biol*, 7(11): 4065-4074.
- ROBERTS C. J., POHLIG G., ROTHMAN J. H., Y STEVENS T. H. **(1989)**. Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J Cell Biol*, 108(4): 1363-1373.
- RODRIGUEZ-GABRIEL M. A., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. **(1998)**. Phosphorylation of ribosomal protein P0 is not essential for ribosome function but can affect translation. *Biochemistry*, 37(47): 16620-16626.
- RUBIN-BEJERANO I., SAGEE S., FRIEDMAN O., PNUELI L., Y KASSIR Y. **(2004)**. The *in vivo* activity of Ime1, the key transcriptional activator of meiosis-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is inhibited by the cyclic AMP/protein kinase A signal pathway through the glycogen synthase kinase 3-beta homolog Rim11. *Mol Cell Biol*, 24(16): 6967-6979.
- SAENZ-ROBLES M. T., REMACHA M., VILELLA M. D., ZINKER S., Y BALLESTA J. P. **(1990)**. The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim Biophys Acta*, 1050(1-3): 51-55.
- SAMBROOK J., Y RUSSELL D. W. **(2006)**. The condensed protocols from molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAN-SEGUNDO P. A., Y ROEDER G. S. **(2000)**. Role for the silencing protein Dot1 in meiotic checkpoint control. *Mol Biol Cell*, 11(10): 3601-3615.
- SANCHEZ-MADRID F., VIDALES F. J., Y BALLESTA J. P. **(1981)**. Functional role of acidic ribosomal proteins. Interchangeability of proteins from bacterial and eukaryotic cells. *Biochemistry*, 20(11): 3263-3266.
- SANTOS C., Y BALLESTA J. P. **(1994)**. Ribosomal protein P0, contrary to phosphoproteins P1 and P2, is required for ribosome activity and *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J Biol Chem*, 269(22): 15689-15696.
- SANTOS C., Y BALLESTA J. P. **(1995)**. The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2. *J Biol Chem*, 270(35): 20608-20614.
- SANTOS C., RODRIGUEZ-GABRIEL M. A., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. **(2004)**. Ribosomal P0 protein domain involved in selectivity of antifungal sordarin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(8): 2930-2936.
- SANTOS C., Y BALLESTA J. P. **(2005)**. Characterization of the 26S rRNA-binding domain in *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk phosphoprotein P0. *Mol Microbiol*, 58(1): 217-226.
- SCHEFFLER I. E. **(2001)**. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*, 1(1): 3-31.
- SHERMAN F. **(2002)**. Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, 350: 3-41.
- SHIMIZU T., NAKAGAKI M., NISHI Y., KOBAYASHI Y., HACHIMORI A., Y UCHIUMI T. **(2002)**. Interaction among silkworm ribosomal proteins P1, P2 and P0 required for functional protein binding to the GTPase-associated domain of 28S rRNA. *Nucleic Acids Res*, 30(12): 2620-2627.
- SICKMANN A., REINDERS J., WAGNER Y., JOPPICH C., ZAHEDI R., MEYER H. E., SCHONFISCH B., PERSCHIL I., CHACINSKA A., GUIARD B., REHLING P., PFANNER N., Y MEISINGER C. **(2003)**. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23): 13207-13212.

- SINGH D., CHANG S. J., LIN P. H., AVERINA O. V., KABERDIN V. R., Y LIN-CHAO S. (2009). Regulation of ribonuclease E activity by the L4 ribosomal protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(3): 864-869.
- SOR F., Y FUKUHARA H. (1983). Complete DNA sequence coding for the large ribosomal RNA of yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 11(2): 339-348.
- SORIANO S., THOMAS S., HIGH S., GRIFFITHS G., D'SANTOS C., CULLEN P., Y BANTING G. (1997). Membrane association, localization and topology of rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B: implications for membrane traffic and Ca²⁺ homeostasis. *Biochem J*, 324 (Pt 2): 579-589.
- SPAHN C. M., BECKMANN R., ESWAR N., PENCZEK P. A., SALI A., BLOBEL G., Y FRANK J. (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*, 107(3): 373-386.
- SPAHN C. M., GOMEZ-LORENZO M. G., GRASSUCCI R. A., JORGENSEN R., ANDERSEN G. R., BECKMANN R., PENCZEK P. A., BALLESTA J. P., Y FRANK J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J*, 23(5): 1008-1019.
- SPENCER J. F. T., SPENCER D. M., Y MILLER R. (1983). Non-Utilization of Sucrose by Petite Mutant of a Distiller's Yeast. *Curr Genet*, 7: 47-50.
- SPIRIN A. S. (2002). Ribosome as a molecular machine. *FEBS Lett*, 514(1): 2-10.
- STARK H., RODNINA M. V., RINKE-APPEL J., BRIMACOMBE R., WINTERMEYER W., Y VAN HEEL M. (1997). Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. *Nature*, 389(6649): 403-406.
- STRYCHARZ W. A., NOMURA M., Y LAKE J. A. (1978). Ribosomal proteins L7/L12 localized at a single region of the large subunit by immune electron microscopy. *J Mol Biol*, 126(2): 123-140.
- SUBRAMANIAN A. R. (1975). Copies of proteins L7 and L12 and heterogeneity of the large subunit of *Escherichia coli* ribosome. *J Mol Biol*, 95(1): 1-8.
- SZICK K., SPRINGER M., Y BAILEY-SERRES J. (1998). Evolutionary analyses of the 12-kDa acidic ribosomal P-proteins reveal a distinct protein of higher plant ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(5): 2378-2383.
- SZYRACH G., OTT M., BONNEFOY N., NEUPERT W., Y HERRMANN J. M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J*, 22(24): 6448-6457.
- TCHORZEWSKI M., BOGUSZEWSKA A., DUKOWSKI P., Y GRANKOWSKI N. (2000a). Oligomerization properties of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: effect of P1A protein phosphorylation on the formation of the P1A-P2B hetero-complex. *Biochim Biophys Acta*, 1499(1-2): 63-73.
- TCHORZEWSKI M., BOLDYREFF B., ISSINGER O. G., Y GRANKOWSKI N. (2000b). Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: evaluation by the two hybrid system. *Int J Biochem Cell Biol*, 32(7): 737-746.
- TCHORZEWSKI M., KROKOWSKI D., BOGUSZEWSKA A., LILJAS A., Y GRANKOWSKI N. (2003). Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A-P2B heterocomplex. *Biochemistry*, 42(12): 3399-3408.
- THOMAS B. J., Y ROTHSTEIN R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4): 619-630.
- TINGLE M. A., KUENZI M. T., Y HALVORSON H. O. (1974). Germination of yeast spores lacking mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, 117(1): 89-93.
- TOMAS P., JIMENEZ-JIMENEZ J., ZARAGOZA P., VULIGONDA V., CHANDRARATNA R. A., Y RIAL E. (2004). Activation by retinoids of the uncoupling protein UCP1. *Biochim Biophys Acta*, 1658(1-2): 157-164.
- TOWBIN H., RAMJOUE H. P., KUSTER H., LIVERANI D., Y GORDON J. (1982). Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. Use to characterize a ribosomal protein not previously identified

- and antigenically related to the acidic phosphoproteins P1/P2. *J Biol Chem*, 257(21): 12709-12715.
- TRAVEN A., WONG J. M., XU D., SOPTA M., Y INGLES C. J. **(2001)**. Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial dna mutant. *J Biol Chem*, 276(6): 4020-4027.
- TRECO D. A., Y LUNDBLAD V. **(2001)**. Preparation of yeast media. *Current Protocols in Molecular Biology*: 13.11.11 - 13.11.17.
- TRECO D. A., Y WINSTON F. **(2008)**. Growth and Manipulation of yeast. *Current Protocols in Molecular Biology*: 13.12.11 - 13.12.12.
- UCHIUMI T., Y KOMINAMI R. **(1997)**. Binding of mammalian ribosomal protein complex P0.P1.P2 and protein L12 to the GTPase-associated domain of 28 S ribosomal RNA and effect on the accessibility to anti-28 S RNA autoantibody. *J Biol Chem*, 272(6): 3302-3308.
- VAN AGTHOVEN A., KRIEK J., AMONS R., Y MOLLER W. **(1978)**. Isolation and characterization of the acidic phosphoproteins of 60-S ribosomes from *Artemia salina* and rat liver. *Eur J Biochem*, 91(2): 553-565.
- VARD C., GUILLOT D., BARGIS P., LAVERGNE J. P., Y REBOUD J. P. **(1997)**. A specific role for the phosphorylation of mammalian acidic ribosomal protein P2. *J Biol Chem*, 272(32): 20259-20262.
- VERSHON A. K., Y PIERCE M. **(2000)**. Transcriptional regulation of meiosis in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, 12(3): 334-339.
- VIDALES F. J., ROBLES M. T., Y BALLESTA J. P. **(1984)**. Acidic proteins of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of phosphorylation. *Biochemistry*, 23(2): 390-396.
- VILELLA M. D., REMACHA M., ORTIZ B. L., MENDEZ E., Y BALLESTA J. P. **(1991)**. Characterization of the yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies. Proteins L44/L45 and L44' have different functional roles. *Eur J Biochem*, 196(2): 407-414.
- WAHL M. C., BOURENKOV G. P., BARTUNIK H. D., Y HUBER R. **(2000)**. Flexibility, conformational diversity and two dimerization modes in complexes of ribosomal protein L12. *Embo J*, 19(2): 174-186.
- WAHL M. C., Y MOLLER W. **(2002)**. Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins. *Curr Protein Pept Sci*, 3(1): 93-106.
- WARNER J. R. **(1989)**. Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 53(2): 256-271.
- WARNER J. R., Y MCINTOSH K. B. **(2009)**. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell*, 34(1): 3-11.
- WESTERMANN B., Y NEUPERT W. **(2000)**. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(15): 1421-1427.
- WIGBOLDUS J. D. **(1987)**. cDNA and deduced amino acid sequence of Drosophila rp21C, another 'A'-type ribosomal protein. *Nucleic Acids Res*, 15(23): 10064.
- WILSON D. M., 3RD, DEUTSCH W. A., Y KELLEY M. R. **(1994)**. Drosophila ribosomal protein S3 contains an activity that cleaves DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem*, 269(41): 25359-25364.
- WOOL I. G., CHAN Y. L., GLUCK A., Y SUZUKI K. **(1991)**. The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. *Biochimie*, 73(7-8): 861-870.
- WOOL I. G. **(1996)**. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 21(5): 164-165.
- YACoub A., KELLEY M. R., Y DEUTSCH W. A. **(1996)**. Drosophila ribosomal protein P0 contains apurinic/apyrimidinic endonuclease activity. *Nucleic Acids Res*, 24(21): 4298-4303.

- YOSHIDA M., KAWAGUCHI H., SAKATA Y., KOMINAMI K., HIRANO M., SHIMA H., AKADA R., Y YAMASHITA I. **(1990)**. Initiation of meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* requires a novel protein kinase homologue. *Mol Gen Genet*, 221(2): 176-186.
- ZAMBRANO R., BRIONES E., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. **(1997)**. Phosphorylation of the acidic ribosomal P proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: a reappraisal. *Biochemistry*, 36(47): 14439-14446.
- ZINKER S. **(1980)**. P5/P5' the acidic ribosomal phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 606(1): 76-82.
- ZUNIGA S., BOSKOVIC J., GARCIA-CANTALEJO J. M., JIM NEZ A., BALLESTA J. P., Y REMACHA M. **(1999)**. Deletion of 24 open reading frames from chromosome XI from *Saccharomyces cerevisiae* and phenotypic analysis of the deletants. *Gene*, 233(1-2): 141-150.
- ZUÑIGA S. **(2000)**. Análisis funcional de seis ORFs de *Saccharomyces cerevisiae*. Implicación de YDL100c en la homeostasis de metales. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid - España.
- ZURDO J., PARADA P., VAN DEN BERG A., NUSSPAUMER G., JIMENEZ-DIAZ A., REMACHA M., Y BALLESTA J. P. **(2000)**. Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk: binding of P1 proteins is required for the interaction of P2 proteins. *Biochemistry*, 39(30): 8929-8934.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNmit: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADP: Ádenosine difosfato

APS: Persulfato de amonio (*amonium persulfate*)

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

ATP: Adenosine trifosfato

BSA: Albúmina de suero bobino (*bobine serum albumin*)

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole

DNAasa: ácido desoxirribonucleico hidrolasa

dNTPs: Desoxirribonucleósidos-trifosfato

DTT: Ditiotreitól

EDTA: Etilén diamino tetracético

GFP: Proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

GTPasa: guanosina trifosfatasa

°C: grados celsius

Ig: Inmunoglobulina

Kb: Kilo base

mg: miligramos

ml.: mililitros

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

PBS: Tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*),

PEG: Polietilenglicol

PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoruro

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

RNAse: Ácido ribonucleico hidrolasa

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil sulfato sódico

³⁵S-Met: Metionina marcada con azufre 35

TAE: Tampón tris-acético Na₄-EDTA

TCA: Ácido tricloro acético

TEMED: N, N, N', N', tetrametilén-metilén-diamina

T_m: temperature de “*melting*” ó fusión

Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano

UTR: Región no traducida (*Un-Translated Region*)

µg: microgramos

µl: microlitros